

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Efectos protectores de la oleoiletanolamida en la  
neuroinflamación inducida por la administración de  
lipopolisacárido o por el consumo intensivo de alcohol**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA  
PRESENTADA POR**

**María Antón Valadés**

Directores

Laura Orio Ortiz  
Fernando Rodríguez de Fonseca

**Madrid, 2015**

# **TESIS DOCTORAL**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGÍA



## **EFFECTOS PROTECTORES DE LA OLEOILETANOLAMIDA EN LA NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DE LIPOPOLISACÁRIDO O POR EL CONSUMO INTENSIVO DE ALCOHOL**

MARÍA ANTÓN VALADÉS

Directores de la Tesis Doctoral

DRA. LAURA ORIO ORTÍZ

DR. FERNANDO RODRIGUEZ DE FONSECA











UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA  
DPTO. PSICOBIOLOGÍA

Dr. LAURA ORÍO ORTIZ, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la Universidad Complutense de Madrid,

y  
Dr. FERNANDO RODRÍGUEZ DE FONSECA, Profesor Titular del Departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la Licenciada MARÍA ANTÓN VALADÉS ha realizado en el Departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la UCM, bajo nuestra dirección, los trabajos experimentales que han conducido a la elaboración de esta Tesis Doctoral, titulada "EFECTOS PROTECTORES DE LA OLEOILETANOLAMIDA EN LA NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DE LIPOPOLISACÁRIDO O POR EL CONSUMO INTENSIVO DE ALCOHOL".

Revisado el presente trabajo, consideramos que tanto el contenido científico como la presente memoria reúnen todos los requisitos necesarios para su defensa, para optar al grado de Doctor.

Y para que conste ante quien proceda, firmamos el presente certificado en Madrid, a 15 de Julio de 2015.

El Director de la Tesis  
Fdo. Laura Orío Ortiz



El Co-Director de la Tesis  
Fdo. Fernando Rodríguez de Fonseca





## Plan Nacional sobre Drogas

Con el presente documento se hace constar que los datos presentados en esta Tesis Doctoral han sido financiados por el Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad (Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas) **PR29/11-18295**.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma la presente en Madrid, a 15 de Julio de 2015.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Laura Orío Ortiz', written over a horizontal line.

Fdo. Laura Orío Ortiz  
Investigador Principal del proyecto.



# ***ABREVIATURAS***

$\alpha\beta$ H4:  $\alpha\beta$ Hidrolasa-4  
2-AG: 2- araquidonil glicerol  
4-HNE: 4-hidroxinonenal  
AA: Ácido araquidónico  
ACTH: Hormona adrenocorticotropa  
AEA: Anandamina  
AP-1: Proteína activadora 1  
CD14: Cluster de diferenciación 14  
CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad  
COX: Ciclooxygenasas  
CRH: Factor liberador de corticotropina  
DAMP: Patrón molecular endógeno de respuesta al daño tisular  
FAAH: Ácido graso aminohidrolasa  
GC: Glucocorticoides  
GP- NAE: Glicerofosfo-N-aciletanolamida  
GPCR: Receptores acoplados a proteína G  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peróxido de hidrógeno  
HMGB1: Proteína de alta movilidad del grupo de caja 1  
HPA: Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal  
I $\kappa$ B: Inhibidores de *Kappa* B  
ICAM: Moléculas de adhesión intercelular  
IFN: Interferones  
IKK: kinasa del inhibidor de Kappa B  
IL-1 $\beta$ : Interleuquina-1 $\beta$   
IL-1R: Receptor de interleuquina-1  
IL-6: Interleuquina-6  
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible  
IRAK: kinasa asociada al receptor de IL-1  
IRF3: Factor 3 de regulación del interferón  
LBP: Proteína de unión a lipopolisacárido  
Liso- PLD: Lisofosfolipasa D  
LOX: Lipoxigenasas  
LPS: Lipopolisacárido  
LRR: Repetición rica en leucinas  
LT: Leucotrienos  
MAGL: Monoacilglicerol lipasa  
MAPK: Proteína kinasa activada por mitógenos  
MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos-1  
MD2: Proteína de diferenciación mieloide 2  
MDA: Malondialdehído  
MMP: Metaloproteinasas de matriz  
MyD88: Factor de diferenciación mieloide 88  
NAAA: N-aciletanolamina hidrolizante ácido amidasa  
NAE: N-aciletanolamida  
NAPE: N-acilfosfatidiletanolamina  
NAPE-PLD: Fosfolipasa D específica de N-aciletanolamida

NAT: N-aciltransferasa  
NCAM: Moléculas de adhesión celular neural  
NF- $\kappa$ B: Factor nuclear de transcripción *kappa* B  
NLR: Receptor tipo NOD  
NO: Óxido Nítrico  
NOD: Dominio de oligomerización de nucleótidos  
 $O_2^-$  : Anión superóxido  
OEA: Oleoiletanolamida  
 $OH^-$  : Radicales hidroxil  
 $ONOO^-$  : Peróxido de nitrito  
PAMP: Patrón molecular asociado a microorganismos patógenos  
PC: Fosfatidilcolina  
PE: Fosfatidiletanolamina  
PEA: Palmitoiletanolamida  
PG: Prostaglandinas  
 $PGE_2$ : Prostaglandinas E 2  
PGES: Prostaglandinas E sintetasas  
PLA/ PLC: Fosfolipasa A/ Fosfolipasa C  
PPAR: Receptor activado por proliferación de peroxisomas  
PPRE: Elementos respuesta a proliferadores de peroxisomas  
PRR: Receptor de reconocimiento de patrones  
RNS: Especies reactivas de nitrógeno  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
RXR: Receptor X retinoide (o receptor 9-cis ácido retinoico)  
SNC: Sistema nervioso central  
STAT: Proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción  
TAK: Proteína quinasa asociada al factor de crecimiento transformante  $\beta$   
TBK1: Kinasa de unión TANK  
TIR: Dominio receptor "Toll"/IL-1  
TLR: Receptor tipo "Toll"  
 $TNF-\alpha$ : Factor de necrosis tumoral- $\alpha$   
TRADD: Proteína adaptadora asociada al dominio de muerte del  $TNF-R$   
TRAF: Factor asociado a receptor del factor de necrosis tumoral- $\alpha$   
TRAM: Molécula asociada a receptor tipo "Toll"  
TRIF: Activador de interferón asociado a receptor tipo "Toll"  
TRPV1: Receptor de vanilloides tipo 1  
TX: Tromboxanos  
VCAM: Moléculas de adhesión vascular

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>1. <u>NEUROINFLAMACIÓN</u></b> .....	<b>11</b>
1.1. <u>DEFINICIÓN</u> .....	11
1.2. <u>EL SISTEMA INMUNITARIO</u> .....	14
1.3. <u>INMUNIDAD INNATA Y NEUROINFLAMACIÓN</u> .....	16
1.3.1. LA MICROGLÍA EN LA NEUROINFLAMACIÓN	
1.3.2. LOS ASTROCITOS EN LA NEUROINFLAMACIÓN	
1.3.3. RECEPTORES DEL SISTEMA INMUNE INNATO	
1.3.3.1. Receptores tipo "Toll"	
1.3.3.2. Receptores tipo "NOD"	
1.4. <u>MARCADORES DE NEUROINFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO</u> .	24
1.4.1. QUIMIOQUINAS	
1.4.1.1. Papel de la proteína quimioatrayente de monocitos-1	
1.4.2. CITOQUINAS	
1.4.2.1. Papel del Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$	
1.4.2.2. Papel de la Interleuquina-1 $\beta$	
1.4.2.3. Papel de la Interleuquina-6	
1.4.3. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	
1.4.3.1. Factor Nuclear de Transcripción <i>kappa</i> B	
1.4.3.2. Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas	
1.4.4. ENZIMAS PRO-INFLAMATORIAS Y PRODUCTOS DE SU ACTIVIDAD	
1.4.4.1. Ciclooxigenasas y Prostaglandinas	
1.4.4.2. Óxido Nítrico Sintasa Inducible y Óxido Nítrico	
1.4.5. EL ESTRÉS OXIDATIVO	
1.5. <u>MARCADORES DE DAÑO CELULAR</u> .....	36
1.5.1. LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y LAS CASPASAS	



1.5.2. LAS PROTEÍNAS DEL GRUPO CAJA 1 DE ALTA MOVILIDAD (HMGB1)	
1.6. <u>NEUROINFLAMACIÓN Y ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</u>	38
<b>2. <u>LAS ACILETANOLAMIDAS:</u></b>	<b>40</b>
2.1. <u>EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y LAS ACILETANOLAMIDAS</u>	40
2.2. <u>BIOSÍNTESIS DE LAS ACILETANOLAMIDAS</u>	41
2.3. <u>CATABOLISMO DE LAS ACILETANOLAMIDAS</u>	43
2.4. <u>LA ANANDAMIDA Y LA INFLAMACIÓN</u>	44
2.5. <u>LA PALMITOILETANOLAMIDA Y LA INFLAMACIÓN</u>	45
2.6. <u>LA OLEOILETANOLAMIDA</u>	47
2.6.1. OLEOILETANOLAMIDA, INFLAMACIÓN Y NEUROPROTECCIÓN	
2.7. <u>ENDOCANNABINOIDES, ACILETANOLAMIDAS Y ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</u>	50
<b>3. <u>EL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)</u></b>	<b>52</b>
3.1. <u>ESTRUCTURA DEL LPS</u>	52
3.2. <u>MECANISMO DE ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNE POR LPS</u>	53
3.3. <u>EL LPS Y LAS RESPUESTAS DE FASE AGUDA</u>	55
3.4. <u>EL LPS COMO MODELO DE NEUROINFLAMACIÓN</u>	57
3.5. <u>LA NEUROINFLAMACIÓN POR TRASLOCACIÓN BACTERIANA</u>	60
<b>4. <u>EL ALCOHOL</u></b>	<b>60</b>
4.1. <u>EL CONSUMO INTENSIVO DE ALCOHOL EN ATRACÓN O “BINGE DRINKING”</u>	61
4.2. <u>MODELO “BINGE DRINKING” EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</u>	63
4.3. <u>ALCOHOL Y NEUROINFLAMACIÓN</u>	64
4.3.1. INCREMENTO DE MEDIADORES PRO-INFLAMATORIOS Y ACTIVACIÓN DE CÉLULAS GLIALES	
4.3.2. ACTIVACIÓN DE LOS TLR E INCREMENTO DE LA HMGB1	
4.3.3. INTERACCIONES ENTRE ALCOHOL Y LPS	
4.4. <u>ALCOHOL NEUROINFLAMACIÓN Y ADICCIÓN</u>	68

<i>ANTECEDENTES HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i> .....	71
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> .....	79
<i>ARTÍCULO 1</i> .....	81
<i>ARTÍCULO 2</i> .....	121
<i>DISCUSIÓN GLOBAL</i> .....	139
<i>CONCLUSIONES</i> .....	153
<i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....	159



# ***RESUMEN***

La neuroinflamación se ha desvelado como un proceso común no sólo a las enfermedades neurodegenerativas o derivadas de infecciones del sistema nervioso central, sino que también se observa activación de mecanismos inflamatorios en varias enfermedades mentales así como tras el abuso de sustancias con capacidad adictiva.

El consumo intensivo de alcohol en atracón o *binge drinking* es el patrón de consumo más habitual entre los adolescentes y los jóvenes, aunque se encuentra también muy extendido entre la población adulta. Este tipo de consumo de alcohol provoca importantes daños estructurales, funcionales y cognitivos en el cerebro, especialmente en la corteza frontal, y está relacionado con el aumento del riesgo de desarrollar dependencia al alcohol. El mencionado *binge drinking* ha demostrado su capacidad para activar la respuesta inmune causando neuroinflamación. Esta neuroinflamación se caracteriza por provocar la activación sostenida de las células gliales, el incremento de mediadores pro-inflamatorios, de estrés oxidativo y nitrosativo y en último término provocar neurodegeneración. La administración sistémica de lipopolisacárido (LPS) se ha utilizado como modelo experimental para inducir neuroinflamación. El LPS activa la respuesta inmune/inflamatoria, produce respuestas de fase aguda fisiológicas, como las alteraciones del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y de la termorregulación corporal, e induce síntomas del síndrome constitutivo o "*sickness behavior*", entre los que se encuentra la anhedonia. Este estado alterado es común a patologías que cursan con neuroinflamación incluyendo la adicción al alcohol.

Debido a la creciente incidencia de las patologías que cursan con neuroinflamación numerosos estudios se han centrado en ella como posible diana para el desarrollo de nuevos tratamientos efectivos. Se desconoce con exactitud el potencial efecto terapéutico o de agravamiento producido por la administración de mediadores naturales capaces de controlar los mecanismos implicados en la neuroinflamación. En la presente Tesis Doctoral se pretende explorar la potencial acción neuroprotectora y anti-inflamatoria de un compuesto natural de naturaleza lipídica, la oleoiletanolamida (OEA), derivado de la membrana celular, y comparar su potencia anti-inflamatoria con su congénere, la palmitoiletanolamida (PEA). Estos compuestos naturales podrían suponer una alternativa terapéutica racional para la neuroinflamación asociada a la adicción a drogas como el alcohol.

Teniendo en cuenta estos indicios, nos planteamos las siguientes hipótesis:

- La OEA ejerce un papel anti-inflamatorio y neuroprotector frente a la neuroinflamación y el daño neuronal inducidos por el consumo intensivo de alcohol en atracón o *binge drinking*.
- La OEA puede modular la respuesta inmune/inflamatoria, al igual que otras aciletanolamidas como la PEA, producida por la administración sistémica de LPS.
- Las aciletanolamidas OEA y PEA pueden regular la activación de las respuestas de fase aguda fisiológicas y comportamentales producidas tras la inyección sistémica de LPS.

Para comprobar nuestras hipótesis llevamos a cabo los siguientes estudios en rata:

Primero se realizó una curva temporal de expresión de los principales marcadores pro-inflamatorios en la corteza frontal tras un protocolo de administración de altas dosis de alcohol intragástrico 3 veces al día durante 4 días consecutivos. Los resultados mostraron que los principales marcadores pro-inflamatorios se encontraban elevados entre la 1h y las 6h tras la última administración oral de alcohol. Posteriormente en otro estudio se pre-administró intraperitonealmente OEA (10 mg/kg) 10 minutos antes de cada administración oral de alcohol. Las muestras se tomaron 2-4h tras la última dosis de alcohol, de acuerdo a los resultados de la curva temporal. Los resultados de este estudio mostraron que la OEA disminuyó los niveles de corticosterona en plasma incrementados por el alcohol sin modificar los niveles de alcohol en sangre, por lo que la OEA regula la activación del eje HPA sin influir en el metabolismo del alcohol. El pre-tratamiento con OEA mostró potentes efectos anti-inflamatorios ya que redujo los niveles de citoquinas plasmáticas pro-inflamatorias y reguló la respuesta inmune/inflamatoria en corteza frontal reduciendo la expresión y activación de los receptores tipo "toll" 4 de la inmunidad innata y de sus proteínas accesorias (MD2/MyD88), inhibiendo la activación de la vía del factor nuclear de transcripción *kappa* B y disminuyendo los niveles de citoquinas, quimioquinas y enzimas pro-inflamatorias, todos ellos parámetros incrementados por el consumo intensivo de alcohol en atracón. El aumento del estrés oxidativo, de la peroxidación lipídica, de la activación de la vía de las caspasas apoptóticas y de la expresión de las proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1 indicadoras de daño celular, producidas por el consumo de alcohol en atracón, se vio reducido por el pre-tratamiento con OEA, por lo que ésta presenta una función neuroprotectora frente al abuso de alcohol.

En un segundo estudio realizado también en rata, se analizó el efecto protector de la pre-administración intraperitoneal de OEA (10 mg/kg) en la neuroinflamación y las respuestas de fase aguda inducidas por la administración sistémica de LPS (0,5 mg/kg), comparando los efectos con la pre-administración intraperitoneal de otra aciletanolamida, la PEA (10 mg/kg). Se comprobó que en este modelo en rata la OEA y la PEA presentan efectos anti-inflamatorios y anti-oxidantes similares ya que son capaces de inhibir la actividad transcripcional del factor nuclear de transcripción kappa B, elemento central de la respuesta inflamatoria, en corteza frontal, de reducir los niveles de mediadores pro-inflamatorios (citoquinas pro-inflamatorias plasmáticas y citoquinas, enzimas y prostaglandinas pro-inflamatorias en corteza frontal) así como de disminuir los niveles de peroxidación lipídica elevados tras la administración de LPS.

Respecto a la actividad de estas aciletanolamidas en las respuestas de fase aguda activadas por el LPS, se observó que la OEA y la PEA acentúan la hipotermia causada por el LPS y disminuyen los niveles de las moléculas pirógenas endógenas incrementadas en el hipotálamo tras la administración de LPS. Ya que la hipotermia se considera un mecanismo de supervivencia, los resultados sugieren que estas aciletanolamidas, actuando sobre la termorregulación, ejercerían efectos beneficiosos intentando recuperar la homeostasis frente a un daño o infección. En cuanto a la activación del eje HPA, la administración aguda de OEA y PEA no afectó a los niveles de corticosterona alterados tras el LPS, al contrario de lo que sucedió con la administración repetida de OEA en el experimento de administración de alcohol. En cuanto a la respuesta comportamental, se observó que la OEA, pero no la PEA, es capaz de disminuir la anhedonia producida por el LPS, por lo que la OEA podría ser más beneficiosa regulando el estado motivacional negativo asociado a enfermedades que cursan con neuroinflamación.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la OEA tiene propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes similares a las de la PEA, posee un papel neuroprotector frente al daño cerebral relacionado con la respuesta neuroinmune/inflamatoria en la corteza frontal y es capaz de regular las respuestas de fase aguda y comportamentales alteradas, proponiéndose por todo ello como una alternativa farmacológica para tratar patologías neuropsiquiátricas que cursan con neuroinflamación, incluyendo el abuso y la adicción al alcohol.

# ***SUMMARY***

Neuroinflammation is a process that can be observed not only in neurodegenerative diseases but also in infection-based alterations of the central nervous system, mental illnesses and after abuse of addictive substances.

Binge drinking is the most common pattern of alcohol consumption among adolescents and youngsters, although it is also extended in the adult population. These kind of alcohol consumption leads to remarkable brain damage in terms of structure, functionality and cognition. The frontal cortex appears to be especially sensible to these effects, being related with the risk of developing alcohol dependence. Binge drinking has been shown to activate the acute phase responses as well as the immune response, processes that eventually trigger neuroinflammation. This event is characterized by the sustained activation of glial cells and the increase of pro-inflammatory markers. Together with the induction of oxidative and nitrosative stress, it results in neurodegeneration.

Due to the increasing incidence of neuroinflammatory pathologies, numerous studies have been focus on this process as a potential target in the development of new and more effective treatments. In this sense, the potential therapeutic effect of a number of natural regulators of neuroinflammation has not been fully understood. In the present doctoral thesis, we aimed at characterizing the potential neuroprotective and anti-inflammatory actions of a natural compound derived from the cell membrane, the oleoylethanolamine (OEA). We have also compared the anti-inflammatory effects of OEA with his structurally-related molecule the palmitoylethanolamine (PEA). These natural compounds might represent a new alternative in the treatment of the neuroinflammation associated to alcohol abuse.

Considering these evidences, we designed our study in order to evaluate and challenge the following hypotheses:

- OEA plays an anti-inflammatory and neuroprotective role against the neuroinflammation and the neuronal damage caused by binge alcohol drinking.
- OEA, as well as other acylethanolamines such as PEA, can modulate the immune/inflammatory response produced by the systemic injection of lipopolysaccharide (LPS).

- OEA and PEA regulate the activation of the physiological and behavioral acute responses triggered by the systemic injection of LPS.

In order to corroborate our hypotheses, we carried out the following experiments in rats:

Firstly, we studied the time-course of expression of main pro-inflammatory markers in frontal cortex after a binge alcohol drinking protocol based in high intragastric doses of alcohol administered 3 times per day over 4 consecutive days. The increase in main pro-inflammatory markers took place in a time window between 1 hour to 6 hours after the last alcohol gavage. Secondly, we pre-treated the rats with intraperitoneal injections of OEA (10 mg/kg) 10 minutes prior to each alcohol gavage administration. According to previous observations in our experiment, animals on this study were killed and sampled during the time frame between 2 and 4 hours after last alcohol dose. We found that OEA diminished the increase in corticosterone observed in rats treated with alcohol but not the blood ethanol levels, suggesting that OEA regulates the activation of the HPA axis without affecting alcohol metabolism. In addition, OEA pre-treatment shows anti-inflammatory properties since it reduces the plasma levels of pro-inflammatory cytokines that are enhanced in rats exposed to the model of binge alcohol drinking. Interestingly, OEA also reduces the activation of the innate immune toll like receptor 4 and its accessory proteins (MD2 and MyD88) in the frontal cortex. In this brain area, OEA is also able to inhibit the nuclear factor *kappa* B transcriptional activity, thus reducing the expression of cytokines, chemokines and pro-inflammatory enzymes that are usually enhanced during binge alcohol drinking. Regarding neuroprotection, OEA also blocks the binge alcohol drinking-associated increase in oxidative stress, lipid peroxidation, apoptotic-related caspases and the high-mobility group protein 1, a common marker of cellular damage.

We conducted a second experiment to test the effects of OEA and other acylethanolamide, PEA, in the neuroinflammatory response induced by systemic administration of LPS. We evaluated the effects of intraperitoneally OEA (10 mg/kg) and PEA (10 mg/kg) injections 10 minutes prior to the administration of LPS (0,5 mg/kg). Our results demonstrated that OEA and PEA have similar anti-inflammatory and anti-oxidative capacities due to their ability to inhibit the nuclear factor *kappa* B pathway, a key element in the inflammatory response, in the frontal cortex. We also observed that both acylethanolamides reduce pro-inflammatory markers (pro-



inflammatory cytokines in plasma and pro-inflammatory chemokines, enzymes and prostaglandins in the frontal cortex) and the levels of lipid peroxidation that were increased by the treatment with LPS.

Finally, we also analyzed the action of the acylethanolamides in the acute phase responses triggered by LPS. It was found that both OEA and PEA enhanced the hypothermia caused by LPS. This was accompanied by a reduction of the LPS-mediated increase in the levels of pyretic molecules in the hypothalamus in pre-treated animals. Since hypothermia is considered a mechanism of survival, these acylethanolamides might exert beneficial effects by recovering the homeostasis after exposure to a noxious stimulus such as damage or infection. Contrary to the results from the binge alcohol drinking experiment, in which OEA was pre-administered in a repeated dose pattern, acute doses of OEA or PEA were not able to reduce the corticosterone levels increased by LPS injection. Finally, at the behavioral level, we observed that OEA, but not PEA, was able to diminish the LPS-induced anhedonia, suggesting that OEA might regulate the negative motivational state associated to neuroinflammation.

In summary, our findings suggest that OEA has anti-inflammatory and anti-oxidative properties similar to those of PEA. It also plays a neuroprotective role against the cellular damage associated with the immune/inflammatory response in the rat frontal cortex. Additionally, OEA is able to block the acute phase responses, including behavioral reactions to neuroinflammation. Consequently, OEA should be considered as a pharmacologic alternative for the treatment of neuroinflammation-associated neuropsychiatric diseases, including alcohol abuse and addiction.





# ***INTRODUCCIÓN***



# **1. NEUROINFLAMACIÓN:**

## **1.1. DEFINICIÓN:**

La neuroinflamación es, principalmente, un complejo mecanismo de protección del organismo dirigido a aislar el tejido afectado, destruir las células dañadas y restaurar la integridad tisular (Correale y Villa, 2004). Los efectos de la neuroinflamación se consideran neuroprotectores cuando esta actividad inflamatoria se produce durante un periodo corto de tiempo, en cambio, cuando este proceso inflamatorio es excesivo en intensidad o duración se convierte en dañino para el SNC y puede empeorar numerosas enfermedades (Shastri et al., 2013; Garcia-Bueno et al., 2010).

La división que tradicionalmente se hacía entre enfermedades inflamatorias y enfermedades neurodegenerativas cambia con el concepto de neuroinflamación. En los últimos años se ha demostrado el importante papel que ejerce la neuroinflamación en la patogénesis de un amplio espectro de enfermedades cerebrales, convirtiéndose en una diana principal de los tratamientos neuroprotectores.

A pesar de la presencia de la barrera hematoencefálica, el sistema nervioso central (SNC) responde al estímulo inflamatorio periférico produciendo como respuesta local neuroinflamación, y generando la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y otras respuestas de fase aguda (letargia, somnolencia, fiebre, anorexia) denominadas síndrome constitucional “sickness behaviour” cuya finalidad es restablecer la homeostasis tras el desequilibrio de la fisiología normal causado por una infección o daño (Allan y Rothwell, 2003).

Las interacciones entre sistema nervioso, el eje HPA y componentes del sistema inmune juegan un papel importante en inflamación e inmunidad (Rivest, 2001). El SNC regula el sistema inmunológico principalmente a través de dos mecanismos, la respuesta hormonal al estrés y la producción de glucocorticoides (GC), y el sistema nervioso autónomo con el aumento de noradrenalina. El SNC también puede regular el sistema inmune local a través de los nervios periféricos con el aumento de neuropéptidos como la sustancia P y la producción del factor liberador de corticotropina (CRH), principal orquestador de la respuesta integrada (hormonal, autónoma y comportamental) al estrés.

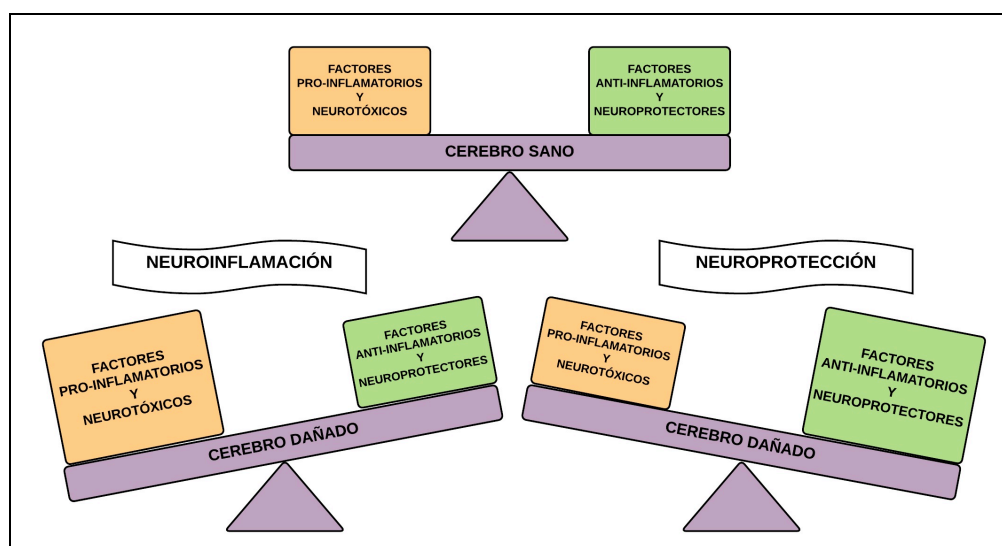
Los principales componentes del eje HPA son el núcleo paraventricular en el hipotálamo, la adenohipófisis o lóbulo anterior de la glándula pituitaria y las glándulas

adrenales. El CRH es secretado por el núcleo paraventricular que actúa sobre la pituitaria y estimula la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) a la sangre. Después, la ACTH llega a las glándulas adrenales donde produce la expresión y aumento de GC. Los GC realizan un feedback negativo sobre el eje HPA (ejerciendo su efecto sobre el hipotálamo y la pituitaria) mediante la inhibición de citoquinas y mediadores neuroinflamatorios. El eje HPA se activa para regular la excesiva respuesta del sistema inmune producida por un estímulo inflamatorio. El eje HPA y los GC en particular son esenciales para limitar y resolver el proceso inflamatorio (Webster et al., 2002). Alteraciones a cualquier nivel del eje HPA o en la acción de los GC producen una desregulación del circuito neuroendocrino produciendo cambios sistémicos en inflamación o inmunidad. Los receptores de glucocorticoides son muy reactivos a los cambios de concentración de GC. Estos receptores se expresan en mayor medida en regiones cerebrales como la pituitaria, el hipocampo, el cortex cerebral, el cortex olfatorio, la amígdala y el núcleo paraventricular del hipotálamo (Morimoto et al., 1996). La acción anti-inflamatoria de los GC se basa principalmente en su capacidad para inhibir la vía inflamatoria del factor nuclear de transcripción *kappa* B (NF- $\kappa$ B), mediante el incremento de la expresión de proteínas inhibitorias o el bloqueo de la unión del NF- $\kappa$ B al DNA por interacción de los receptores de glucocorticoides con la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B (De Bosscher et al., 2003). En el sistema nervioso dañado los GC podrán ejercer efectos anti o pro-inflamatorios dependiendo del lugar sobre el que actúen, la duración del estímulo y la concentración en la que se encuentren. Niveles elevados de GC son pro-inflamatorios mientras que los niveles basales tienen efectos tradicionalmente anti-inflamatorios (Sorrells y Sapolsky, 2007). La elevación de los niveles de GC y la ocupación de los receptores de glucocorticoides produce entre otras consecuencias negativas neurotoxicidad. Estos efectos nocivos pueden producirse por varios mecanismos entre los que destacan la inhibición de la utilización de glucosa por las células cerebrales o el incremento de la excitotoxicidad por el aumento de la concentración de aminoácidos excitadores, principalmente de glutamato.

Por tanto, podemos diferenciar, por una parte, la **neuroinflamación aguda**, que produce activación de la microglía y aumento de mediadores inflamatorios como citoquinas y quimioquinas, considerada generalmente beneficiosa ya que intenta minimizar daños y reparar el tejido afectado; por otra parte, la **neuroinflamación crónica**, que sería una situación de respuesta inflamatoria prolongada y autopropetuada

que además de producir la activación de la microglía y aumento continuado de mediadores inflamatorios también produce estrés oxidativo y nitrosativo. El aumento sostenido de los mediadores perpetúa el ciclo inflamatorio, activando más microglía, promoviendo su proliferación y resultando en mayores aumentos de factores inflamatorios. También se produce la alteración de la barrera hematoencefálica que incrementa la infiltración de macrófagos periféricos en el parénquima cerebral que prolongan la inflamación (Rivest, 2009). Como ya se ha mencionado, esta inflamación crónica, en vez de actuar como protectora es perjudicial para el tejido nervioso. Concretamente, la neuroinflamación crónica y los excesivos niveles de citoquinas/quimioquinas están asociados con muchas enfermedades neurodegenerativas agudas y crónicas (esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica) (Frank-Cannon et al., 2009) y también con enfermedades psiquiátricas, como la depresión o el estrés crónico (Dantzer et al., 2008; Munhoz et al., 2008), así como en el alcoholismo (Guerri y Pascual, 2010).

En el cerebro existe un balance entre factores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. Frente a un daño que incrementa niveles de factores pro-inflamatorios actuarán factores neuroprotectores intentando compensar esa respuesta y devolver el equilibrio homeostático. Cuando la respuesta pro-inflamatoria es predominante y se prolonga en el tiempo, ésta tendrá consecuencias perjudiciales y provocará daño neuronal (**Figura 1**).



**Figura 1.** Balance entre neuroinflamación y neuroprotección en el cerebro que se produce para conservar la homeostasis. Tras un daño, si el incremento de los factores pro-inflamatorios y neurotóxicos es elevado o se prolonga en el tiempo, se producirá neuroinflamación. Si por el contrario no son tan elevados y se encuentran localizados, el incremento de los factores anti-inflamatorios producirá neuroprotección.



A grandes rasgos, la inflamación en el SNC implica principalmente activación de microglía, astrogliosis, reclutamiento de células blancas periféricas, edema, activación del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), síntesis de proteínas de respuesta de fase aguda sistémicas, activación del complemento, acumulación de citoquinas pro-inflamatorias, aumento de expresión y actividad del NF- $\kappa$ B, de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión celular neural (NCAM) y metaloproteinasas de matriz (MMP-9) en células periféricas y en células del parénquima cerebral (Allan y Rothwell, 2003).

La inflamación, con el incremento de numerosos mediadores específicos por diversas células del sistema inmune, se considera un proceso biológico regulado tanto por el sistema inmune innato como por el adaptativo, que ayuda al organismo a erradicar una infección (Medzhitov, 2008).

## 1.2. EL SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmune se divide en dos: el innato y el adquirido. La actividad combinada de ambos organiza la respuesta inmune, pero cada uno posee funciones específicas para facilitar la recuperación tras un daño o infección en el organismo. La **inmunidad innata** es una reacción inicial de defensa del organismo. Esta respuesta es rápida, no específica y mediada principalmente por células de origen mieloide (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas). La **inmunidad adquirida (o adaptativa)** responde con menos rapidez pero confiere una inmunidad duradera. Consta de dos tipos de respuestas: la inmunidad humoral y la celular. La humoral está mediada por moléculas de la sangre y es la principal defensa contra los microorganismos extracelulares y toxinas. La inmunidad celular, llevada a cabo principalmente por linfocitos T, crea una respuesta inmune específica de antígeno. Esta respuesta adquirida cuenta con una característica especial, la memoria inmunológica específica frente al patógeno, que confiere al sistema la capacidad para recordar al patógeno en posteriores infecciones produciendo así una respuesta más rápida y eficaz. La inmunidad adquirida puede considerarse natural, cuando ocurre en el organismo tras una enfermedad o infección, o artificial, cuando se induce externamente mediante vacunas.

El **sistema inmune innato** está constituido por:

- Factores solubles: entre los que destacan proteínas de fase aguda (proteína C reactiva), citoquinas (interferones, interleuquinas, quimioquinas, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) o el sistema del complemento (conjunto de proteínas implicadas en inflamación). Las actividades de los principales factores solubles serán detalladas en el punto 1.4 de la presente Tesis Doctoral.
- Receptores de la inmunidad innata: que reconocen patrones específicos tanto de patógenos exógenos como de moléculas endógenas. Los diferentes tipos de receptores y sus funciones principales serán comentados con más detalle en el punto 1.3.3 de esta Tesis Doctoral.
- Células: que pueden tener un origen mieloide o linfoide. Las células de **origen linfoide**, llamadas células “*Natural Killer*” se encargan de la eliminación de células tumorales y células infectadas. Desarrollan su capacidad para eliminar células diana de forma natural y dependiente de anticuerpo. Además, secretan factores solubles que regulan las funciones de otras células del sistema inmune, por tanto se consideran células efectoras tanto de inmunidad innata como de adquirida. Entre las que se originan en la **médula ósea** se pueden diferenciar:
  - Granulocitos o células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) presentes en el torrente sanguíneo con actividad en inflamación aguda y, junto con anticuerpos y proteínas del complemento, en protección contra infecciones.
  - Mastocitos: tienen un papel importante en alergia e inflamación. Son capaces de secretar una gran variedad de moléculas solubles (como proteasas y varios tipos de eicosanoides). Mediante la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y quimioatrayentes (quimioquinas) producen la atracción y potenciación de la actividad de otras células inmunes al cerebro.
  - Células dendríticas: con actividad fagocítica. Son capaces de presentar el antígeno a los linfocitos iniciando la respuesta inmune adquirida.
  - Monocitos: se localizan en la sangre, en su mayoría adheridos a las paredes del endotelio. Son capaces de migrar hacia los tejidos donde se transforman en macrófagos. Se encuentran en varios tejidos y en el SNC serán las células de la microglía. Los macrófagos participarán en la reparación tisular, en la fagocitosis,

en los procesos de inflamación/fiebre, en la actividad citotóxica frente a tumores y también en el sistema inmune adquirido mediante la presentación del antígeno (función que comparte con las células dendríticas) y la producción de mediadores como citoquinas o interferones activando la respuesta inmune adquirida.

El **sistema inmune adquirido** está formado por componentes humorales (anticuerpos, complemento y citoquinas) y por componentes celulares (Células B, Células T y Células que adquieren especificidad a través de los anticuerpos como las células “*natural killer*” y los macrófagos).

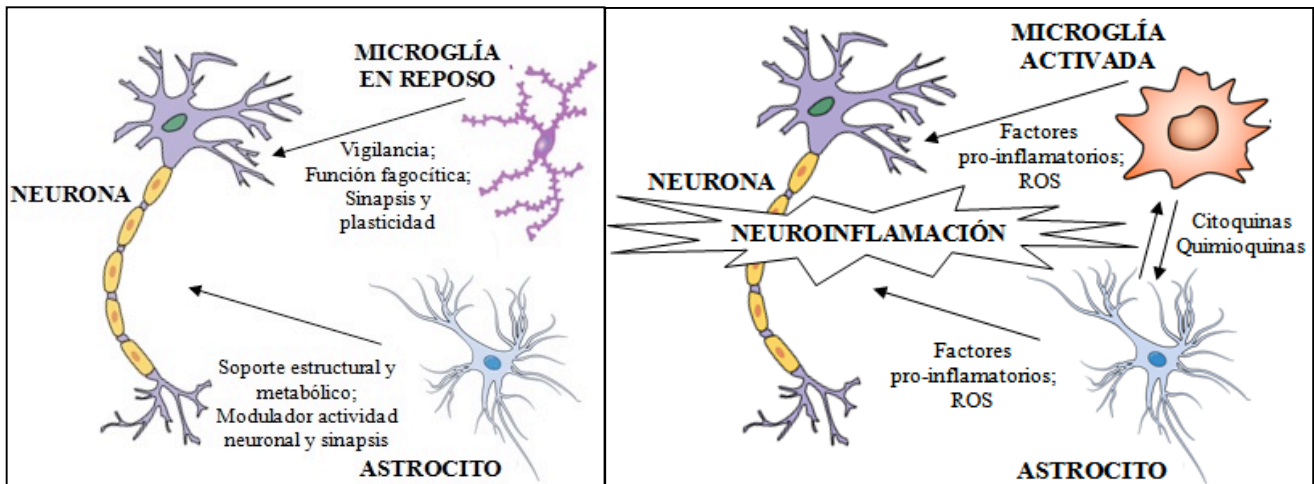
Las células B (linfocitos B) maduran en la médula ósea y son esenciales para la actividad humoral o mediada por anticuerpos. Las células T (linfocitos T) completan su maduración en el timo y realizan dos tipos de actividades: una reguladora (linfocitos T-“helper”) y otra efectora (linfocitos T citotóxicos). Gracias a receptores específicos de superficie que se encargan del reconocimiento de antígeno se produce la activación de los linfocitos B y T. En el caso de los B el receptor consiste en inmunoglobulinas unidas a membrana capaces de fijar un epítipo específico y en el caso de los T el receptor reconoce un péptido antigénico procesado en asociación con una proteína de reconocimiento de lo propio del CMH.

### 1.3. INMUNIDAD INNATA Y NEUROINFLAMACIÓN

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo y la inflamación una de las primeras respuestas de este ante una infección (Kawai y Akira, 2006). A pesar de la presencia de la barrera hematoencefálica, el cerebro no es un sistema aislado y existe comunicación entre sus células inmunes y las de la periferia. Las células del sistema inmune tienen acceso al SNC (fluido cerebroespinal, meninges y parénquima cerebral) tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En la neuroinflamación el aumento de mediadores pro-inflamatorios se produce tanto por producción local en el SNC como por reclutamiento desde el sistema periférico tras la alteración de la barrera hematoencefálica (Erickson et al., 2012).

La comunicación entre neuronas, glía (microglía y astrocitos) y células periféricas inmunes es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del cerebro así como para la regulación activa de la respuesta inmune (**Figura 2**). Alteraciones morfológicas y

funcionales en neuronas y microglía durante la edad, el estrés o la inflamación perturban la comunicación entre esas células produciendo una desregulación neuroinmune con consecuencias negativas en el comportamiento y la función cerebral (Tian et al., 2012).



**Figura 2.** Representación esquemática de la interacción de las células del SNC. **A.** Comunicación entre neuronas y glía en el mantenimiento de la homeostasis del cerebro. **B.** Comunicación entre las células tras un daño que desencadena la respuesta inmune. La respuesta inflamatoria se caracteriza por el incremento en la expresión de factores pro-inflamatorios que pueden llegar a causar neuroinflamación y muerte neuronal.

### 1.3.1. LA MICROGLÍA EN LA NEUROINFLAMACIÓN

La neuroinflamación se relaciona principalmente con la activación del sistema inmune innato. El cerebro consta de células inmunes propias, la microglía, que bajo condiciones fisiológicas realizan funciones de vigilancia y comunicación con astrocitos y neuronas mediante la secreción de moléculas anti-inflamatorias y factores neurotróficos (Streit, 2002). La microglía puede presentarse en dos estados:

- Microglía en reposo: estado durante el cual realiza las funciones de vigilancia y monitorización (Nimmerjahn et al., 2005). Gracias a su papel fagocítico, esta microglía también participa en el control de la poda sináptica durante el desarrollo (“pruning”), y la regulación de la supervivencia y conectividad neuronal al modular los procesos de apoptosis neuronal y la neurogénesis (Paolicelli et al., 2011; Sierra et al., 2010). Mediante la secreción de bajos niveles de citoquinas, proteínas del complemento y factores de crecimiento, se encuentra implicada en funciones sinápticas y de plasticidad (Bessis et al., 2007).

- **Microglía activada:** en presencia de un estímulo activador, daño o invasión patógena la célula cambia a un estado de protección y reparación. Esta forma activada incrementa la expresión de receptores de superficie relacionados con la respuesta inmune innata, entre otros, receptores para compuestos de glicosilación avanzada, receptores "scavenger", receptores fagocíticos (receptores de complemento CR3 y CR4), receptores tipo "Toll" (TLR) y receptores tipo NOD (NLR), siendo estos dos últimos los activados en mayor proporción. Tras la activación, la microglía adopta una morfología ameboide e inicia una respuesta rápida que implica migración y proliferación hacia el lugar del daño donde fagocitará células muertas y eliminará restos celulares. La activación de la microglía implica tanto una respuesta inmune innata como adquirida a través de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleuquina-6 (IL-6)) y quimioquinas (proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1)) que promueven el estado inflamatorio (Bailey et al., 2006; Block y Hong, 2005;). También se produce aumento del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, de la expresión del CMH de clase I y II, complemento C3, e incremento de enzimas oxidativas como la NADPH oxidasa. Todos estos factores propagan y mantienen la neuroinflamación a través de numerosos mecanismos que incluyen la activación de fosfolipasas (PLA), ciclooxigenasas (COX) y lipoxigenasas (LOX), que causan incremento de ácido araquidónico (AA) desde fosfolípidos de membrana y generando lisoglicerofosfolípidos, factor activador de plaquetas, prostaglandinas (PG) pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Philips et al., 2006; Kettenmann et al., 2011).

Como se ha señalado anteriormente, la inflamación debe tener una respuesta autolimitada y debe resolverse una vez eliminada la causa de su activación, pero cuando esto no sucede las consecuencias serán perjudiciales. En concreto, la activación prolongada de las células microgliales en enfermedades neurodegenerativas que cursan con inflamación tiene un impacto negativo sobre la progresión de estas enfermedades. Para poder regular la respuesta inmune la microglía también cuenta con capacidad de producción de citoquinas y factores de crecimiento con actividad anti-inflamatoria (Ekdahl et al., 2009). El balance entre la actividad pro y anti-inflamatoria de la

microglía afectará al resultado de la neuroinflamación y a los mecanismos de regeneración y reparación.

### 1.3.2. LOS ASTROCITOS EN LA NEUROINFLAMACIÓN

Tradicionalmente se había considerado que los astrocitos realizaban únicamente función de soporte estructural y metabólico de las neuronas. Sin embargo, diversos estudios han demostrado su papel modulador en la actividad neuronal (Halassa y Haydon, 2010) o en la transmisión sináptica (Henneberger et al., 2010). Cualquier daño sobre el SNC produce cambios en la morfología y estructura de los astrocitos en un proceso conocido como astrogliosis reactiva. Durante la astrogliosis se produce un incremento en la expresión de marcadores inmunológicos y de estrés oxidativo, de factores de crecimiento y citoquinas (Farina et al., 2007) demostrándose así su participación en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa. Los astrocitos, como la microglía, expresan una serie de receptores del sistema inmune innato como TLR, NLR, receptores *scavenger* y receptores de manosa que juegan un papel importante en la neuroinflamación y reparación del tejido. La activación de los astrocitos a través de estos receptores producirá la secreción de los mediadores pro-inflamatorios, citoquinas, quimioquinas y especies reactivas de oxígeno. Los astrocitos también pueden expresar moléculas de adhesión intercelulares y vasculares (ICAM; VCAM) que juegan un papel importante en la unión a receptores de los linfocitos (Gimenez et al., 2004). Tanto la astrogliosis reactiva (Sofroniew y Vinters, 2010) como la activación de la microglía (Cunningham, 2013) se encuentran relacionadas con numerosas enfermedades del SNC que cursan con inflamación.

### 1.3.3. RECEPTORES DEL SISTEMA INMUNE INNATO

Para que el sistema inmune innato comience su respuesta ante una infección o daño es necesario que los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) sean capaces de identificar patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (PAMPs) (Takeuchi y Akira, 2010) o patrones moleculares endógenos de respuesta al daño tisular (DAMPs) (Thundiyil y Lim, 2014). Los PAMPs son una serie de moléculas microbianas que comparten características bioquímicas reconocibles por los PRRs que alertan al organismo de una invasión patógena. Los DAMPs son moléculas endógenas que alertan de un daño celular o tisular. Estas moléculas endógenas reciben en conjunto el nombre

de alarminas y a este grupo pertenecen las proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1 (HMGB1), cuyo papel en inflamación se describe en el punto 1.5.2 de esta Tesis Doctoral. Se han diferenciado cuatro clases de receptores PRRs: receptores tipo "Toll" (TLRs), receptores tipo leptina C, receptores tipo gen I inducible de ácido retinoico y receptores tipo NOD (NLRs). Como ya se ha señalado anteriormente, tanto microglía como astrocitos son capaces de expresar receptores del sistema inmune innato PRRs, entre los que podemos destacar el receptor transmembrana TLR y el citoplasmático NLR debido a su implicación en diversas patologías del SNC.

#### 1.3.3.1. Receptores tipo "Toll"

Los TLRs son la mayor familia de receptores PRR que median la respuesta innata y además sirven de enlace para la respuesta inmune adquirida. Los TLRs se expresan en un gran número de células relacionadas con el sistema inmune como linfocitos B, células "*natural killer*", macrófagos y células dendríticas, aunque también en células no inmunes como en las epiteliales y endoteliales. En el SNC, los TLRs se localizan en astrocitos, oligodendrocitos, neuronas y microglía, siendo en esta última donde se encuentran expresados en mayor proporción (Kielian, 2006). De hecho, en la microglía se expresan todos los tipos de TLRs (Bsibsi et al., 2002). Los TLRs están involucrados en la regulación de la inflamación en el SNC relacionada con enfermedades neurodegenerativas (Okun et al., 2009), con estrés (Garate et al., 2013) o enfermedades psiquiátricas (Pandey et al., 2014).

Los TLR son un tipo de proteínas transmembrana de tipo 1 que se caracterizan por tener un dominio N-terminal extracelular, las llamadas repeticiones ricas en leucinas (LRR) y un dominio citoplasmático altamente conservado llamado receptor Toll/IL-1 (TIR). Los receptores de la interleuquina 1 (IL-1R) también expresan este dominio TIR (O'Neill, 2000). El dominio LRR está involucrado en el reconocimiento específico del patógeno y el dominio TIR en la transmisión de la señal.

Se han descrito, por el momento, 11 tipos de TLRs en el genoma humano y 13 en el de ratón. Dependiendo de la naturaleza del ligando que reconozcan estos TLRs tendrán diferentes tipos de expresión (Dunne y O'Neill, 2003). Por ejemplo, glicolípidos y lipoproteínas serían los ligandos de TLR2, RNA de doble cadena el de TLR3 y lipopolisacárido (LPS) el de TLR4 (explicado con más detalle en el capítulo 3 de esta Tesis Doctoral). Además de los ligandos exógenos, los TLR se pueden unir a ligandos

endógenos como ácido hialurónico, fibrinógeno, fibronectinas o  $\beta$ -defensinas entre otras (Pandey y Agrawal, 2006). También algunas drogas de abuso como el alcohol pueden activar directamente el TLR4 (Alfonso-Loeches et al., 2010). La cascada de señalización desencadenada por activación de los TLRs es compleja e involucra a numerosas moléculas adaptadoras, kinasas y factores de transcripción. Por último, la activación de los TLRs inducirá la transcripción de genes involucrados en la respuesta inflamatoria.

### **Activación de los receptores TLR:**

Una vez unidos a sus ligandos los TLRs pueden activar varias cascadas de señalización dependiendo del tipo de molécula adaptadora a la que se une su dominio TIR (Akira et al., 2006). De entre los cinco tipos de adaptadores con dominio TIR presentan especial relevancia el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y el activador de interferón asociado al TLR (TRIF). Se pueden producir dos tipos de cascadas de señalización celular, una será dependiente del MyD88 (compartida con IL-1R) y la otra dependiente de TRIF. Como resumen, el adaptador será reclutado por el dominio TIR produciendo la activación de NF- $\kappa$ B, éste inducirá la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, y quimioquinas. Todos los TLRs activan la vía de MyD88 excepto el TLR3 que utilizan la vía TRIF y el TLR4 que puede actuar a través de las dos vías (Kawai y Akira, 2010).

#### **➤ Vía MyD88 dependiente:**

El dominio TIR se une a la proteína MyD88 (**Figura 3A**) reclutando y activando a la kinasa asociada al IL-1R 4, IRAK-4, que a su vez hiperfosforila a otros miembros de la familia de las IRAK: IRAK-1 e IRAK-2. Una vez fosforiladas las IRAKs se disocian de MyD88 e interaccionan con el factor 6 asociado al receptor del TNF (TRAF6). El complejo se une con un grupo de proteínas kinasas 1 asociadas al factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TAK1) y sus subunidades activadoras (TAB 1, 2 y 3) produciéndose la activación de dos vías: la del complejo de kinasas del inhibidor de *kappa* B (IKK) y la de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK).

La TAK 1 fosforilada activa el complejo IKK que cataliza la fosforilación de las proteínas inhibidoras de *kappa* B (I $\kappa$ B). Esta fosforilación produce la degradación de I $\kappa$ B y la consiguiente translocación nuclear del NF- $\kappa$ B.



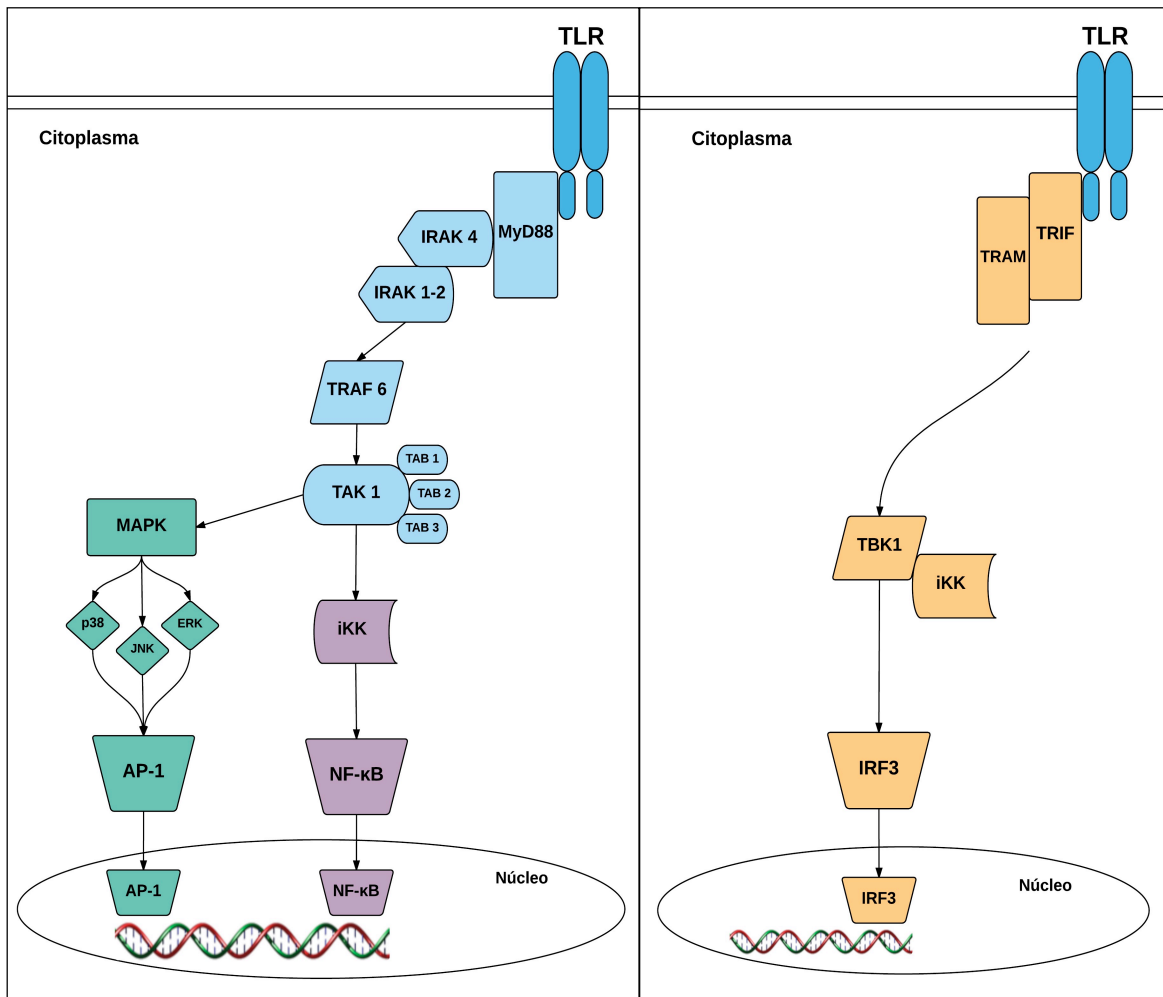
La fosforilación de las MAPK produce la activación del factor de transcripción de la proteína activadora 1 (AP-1).

La activación de ambos factores de transcripción, NF- $\kappa$ B y AP-1, produce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y el TNF- $\alpha$ . Los receptores TLR7, TLR8 y TLR9 tras esta vía dependiente de MyD88, producen la expresión de genes de interferones (IFN).

➤ Vía independiente de MyD88 o TRIF dependiente:

La mayoría de los TLRs actúan exclusivamente a través de la vía dependiente de MyD88. Pero dos tipos de TLRs pueden realizar su función a través de una vía independiente de MyD88 (**Figura 3B**), los TLR3 de forma exclusiva y los TLR4 que activan ambas vías.

Esta vía independiente puede derivar en dos cascadas diferentes de señalización según el tipo de proteína adaptadora que utilice. Así podemos diferenciar una vía que se activa directamente con el adaptador TRIF (vía usada por TLR3) y otra que necesita la unión de una molécula adaptadora, la molécula asociada al TLR (TRAM) a TRIF (vía usada por TLR4). Tras la activación de TRIF, a través de la kinasa 1 de unión TANK (TBK1), se activa el factor 3 de regulación del interferón (IRF3) que se fosforila y se transloca al núcleo donde induce la producción de IFN1 sobre todo de tipo  $\beta$ , de caspasas y de moléculas coestimuladoras. El IFN1 $\beta$  activa la proteína transductora de señal y activadora de la transcripción (STAT) y los genes correspondientes como el de IFN $\beta$ , el de IRF-1, el de la proteína 10 inductora de interferón  $\gamma$  o el de VCAM1.



**Figura 3.** Vías de señalización mediadas por TLR. **A:** Vía dependiente de MyD88. **B:** Vía independiente de MyD88 o TRIF dependiente.

#### 1.3.3.2. Receptores tipo NOD

Los NLR (del inglés, *Nucleotide-binding oligomerization domain like receptors and Leucin-rich repeat*) son receptores citosólicos que se encuentran expresados en células dendríticas, macrófagos, monocitos y también en células epiteliales y son capaces de activar la respuesta inmune innata. Están formados por un dominio central de oligomerización de nucleótidos (NOD), un dominio C-terminal LRR y un extremo N-terminal variable que posee uniones a diferentes tipos de proteínas (Inohara y Nunez, 2003).

Existen dos vías de señalización en la activación de los NLR:

Una vía es la que realizan los NLR mediante la activación del NF-κB y las MAPKs incrementando la transcripción de genes de citoquinas pro-inflamatorias.

La otra vía de señalización de los NLR se realiza a través de la activación de caspasa 1. La activación de esta caspasa 1 produce la rotura de la pro-interleuquina-1 $\beta$  a su forma activa, incrementando la secreción de IL-1 $\beta$  (citoquina pro-inflamatoria), IL-18 (inductora de IFN $\gamma$ ) e IL-33 (involucrada en respuesta de células Th2). La secreción de IL-1 $\beta$  liberará mediadores inflamatorios que ayudarán a la defensa del organismo. Además, esta señalización vía caspasa puede producir una apoptosis celular relacionada con inflamación llamada piroptosis (Bergsbaken et al., 2009), que forma parte normalmente de una respuesta antimicrobiana.

La activación de estos receptores, además de promover procesos de respuesta inmune innata asociados a infección, inflamación o autoinmunidad (Davis et al., 2011), también puede participar en la neuroinflamación asociada a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Heneka et al., 2013), la esclerosis múltiple (Inoue et al., 2012) o incluso la depresión (Zhang et al., 2014).

#### 1.4. MARCADORES DE NEUROINFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO

La neuroinflamación, principalmente a través de la activación de microglía y astrocitos y la infiltración de macrófagos periféricos, provoca el incremento de una serie de marcadores anti y pro-inflamatorios como citoquinas y quimioquinas que inducen y propagan la neuroinflamación a través de la activación de PLA, COX y LOX que generan el factor activador de plaquetas e eicosanoides (PG, leucotrienos (LT) y tromboxanos (TX)). Estos incrementos de citoquinas estarán acompañados de activación de vías de señalización inflamatorias como el NF- $\kappa$ B y otros factores de transcripción. Estas citoquinas también incrementan la producción de óxido nítrico (NO) a través de la acción de la iNOS. Finalmente, al promover la formación de ROS aceleran la peroxidación lipídica dañando la membrana de fosfolípidos.

Las quimioquinas y las citoquinas son proteínas y péptidos bioactivos solubles que están involucrados en un *feedback* a través de la activación de cascadas de proteínas kinasas y PLA<sub>2</sub>. Tanto células del sistema periférico (macrófagos y linfocitos) como del SNC (astrocitos y microglía principalmente) producen la liberación de estos marcadores inflamatorios. Niveles fisiológicos de citoquinas y quimioquinas son necesarios para el metabolismo celular de las neuronas, el mantenimiento de la vigilancia inmune, el tráfico de leucocitos y la captación de otros mediadores inflamatorios. Tanto citoquinas como quimioquinas se encuentran involucradas en la regulación del neurodesarrollo, la

transmisión sináptica y son los principales inductores de neuroinflamación. Realizan su función interaccionando con receptores de membrana específicos compuestos por una región extracelular de unión al ligando y una intracelular que se activa al unirse a las citoquinas o quimioquinas y que transmite la señal al núcleo (Ransohoff et al., 2007). Estas moléculas pueden realizar tanto actividades de neuroprotección como de neuroinflamación. La magnitud y la persistencia de elevados niveles de citoquinas y quimioquinas se encuentra relacionados con la intensidad de la neuroinflamación y con varias enfermedades neurodegenerativas (Lucas et al., 2006).

#### 1.4.1. QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas se clasifican en dos categorías atendiendo a su forma de expresión. Un grupo de quimioquinas se expresa de forma constitutiva y se encarga del mantenimiento de la homeostasis, la vigilancia y el seguimiento del sistema inmune. Otro grupo se expresa de forma inducible durante la inflamación producida tras un daño o estímulo y facilita la respuesta a través de las células del sistema inmune innato y adaptativo.

Las quimioquinas pueden clasificarse estructuralmente en cuatro familias basándose en la secuencia de cisteínas residuales que presenten (Ransohoff, 2009). Las familias reciben los siguientes nombres: C, CC, CXC y CX<sub>3</sub>C. Las quimioquinas ejercen su acción principalmente mediante receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Éstos no son específicos para cada quimioquina, sino que la mayoría pueden ser activados por varios tipos de quimioquinas. Las quimioquinas pueden tener un papel dual, actuando en las células inmunes con funciones atrayentes y activadoras y en neuronas modificando su actividad o supervivencia (Conductier et al., 2010).

Destacan, como algunas de las quimioquinas más importantes en la respuesta inflamatoria, la MCP-1 o la fractalkina (CX3CL1) cuya forma soluble participa en la interacción entre neuronas y otras células inflamatorias (Jones et al., 2010).

##### 1.4.1.1. Papel de la proteína quimioatrayente de monocitos-1

La MCP-1, también llamada quimioquina tipo CC ligando 2 (CCL2), es una quimioquina cuya actividad principal es la regulación de la migración de los monocitos, los linfocitos T y las células “*natural killer*” hacia la zona afectada participando así en

el proceso inflamatorio. Esta quimioquina realiza sus funciones a través del receptor CCR2.

En el SNC la MCP-1 se expresa de forma constitutiva en neuronas y células gliales, siendo los astrocitos su principal fuente de producción tras un daño neuronal o una infección (Ambroisini y Aloisi, 2004). Esta quimioquina juega un papel importante en la neuroinflamación asociada a diversas enfermedades del SNC que implican degeneración neuronal (Gerard y Rollins, 2001). Los astrocitos son capaces de producir quimioquinas en respuesta a la activación por citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ). En cultivos de astrocitos se ha comprobado que estas citoquinas estimulan la producción de MCP-1 mediante la vía del NF- $\kappa$ B (Thompson y Van Eldik, 2009). La MCP-1 puede actuar como inmunomodulador de citoquinas en procesos de neuroinflamación aguda, inhibiendo la liberación de ciertas moléculas inflamatorias (IL-6; TNF- $\alpha$ ) tras la estimulación con LPS o IL-1 $\beta$  (Semple et al., 2010a).

La MCP-1 tendría un papel dual pudiendo actuar como neuroinflamatoria o neuroprotectora (Semple et al., 2010b). Varios estudios demuestran que la supresión de la MCP-1 puede ser beneficiosa en algunas enfermedades ya que se disminuye la inflamación, pero la eliminación total de esta quimioquina es perjudicial ya que afecta a la supervivencia neuronal.

#### 1.4.2. CITOQUINAS

Las citoquinas son producidas por varios estímulos tanto en situaciones fisiológicas como patológicas regulando la inflamación (Mrak y Griffin, 2005). Su producción se encuentra incrementada en estados inflamatorios y su actividad regulará la intensidad y duración de la respuesta inmunitaria. Las citoquinas son un diverso grupo de factores pro y anti-inflamatorios que se agrupan en diferentes familias basándose en el tipo de receptor al que se unen. Las principales citoquinas pro-inflamatorias son el TNF- $\alpha$ , las interleuquinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) y los IFN. Entre las que presentan efectos anti-inflamatorios podemos encontrar la IL-10 y la IL-4.

##### 1.4.2.1. Papel del Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$

El TNF- $\alpha$ , a niveles fisiológicos en el cerebro, participa en la regulación homeostática, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria, el sueño y la ingesta. Pero en situaciones patológicas niveles aumentados de esta citoquina se relacionan con

neuroinflamación y con enfermedades neurodegenerativas (Montgomery y Bowers, 2012; Frankola et al., 2011).

Tiene un papel central en la iniciación y regulación de la cascada de citoquinas durante la respuesta inflamatoria. Esta citoquina pleiotrópica, sintetizada por macrófagos, astrocitos, neuronas y principalmente por microglía, ejerce acciones pro-inflamatorias durante la fase aguda de la respuesta inflamatoria en el SNC pero acciones inmunosupresoras durante la fase crónica (Lucas et al., 2006). El TNF- $\alpha$ , al igual que otras interleuquinas, también puede causar daño en la barrera hematoencefálica por aumento de NO en el endotelio vascular y regulando al alza moléculas de adhesión relacionadas con la invasión de leucocitos (Allan y Rothwell, 2001).

El TNF- $\alpha$  se produce como una proteína precursora unida a membrana cuyo dominio extracelular se adhiere a la enzima convertidora de TNF liberándose el TNF- $\alpha$  soluble. Tanto la proteína soluble como la transmembrana son biológicamente activas y actúan a través de dos receptores de superficie, TNF-R1 y TNF-R2, que son diferentes en sus formas de expresión, transducción de la cascada de señalización y afinidad por el TNF- $\alpha$  (MacEwan, 2002).

El TNF- $\alpha$  en el cerebro el TNF-R1 se expresa en microglía, astrocitos y neuronas. Se activa por ambas formas de TNF- $\alpha$ , tanto la unida a membrana como la soluble. El TNF-R2 se expresa principalmente en células endoteliales y hematopoyéticas y sólo se activa con la forma unida a membrana. El TNF-R1 presenta un dominio citoplasmático relacionado con muerte celular.

La activación del TNF-R1 ocurre por oligomerización y requiere la internalización del complejo ligando-receptor. La unión del TNF- $\alpha$  al dominio extracelular del TNF-R1 produce su activación y la captación de la proteína adaptadora asociada al dominio de muerte del TNF-R (TRADD). Por una parte, TRADD puede unirse al dominio de muerte asociado a Fas, FADD, mediando la activación de las caspasas 8 y 10. Por otra parte, TRADD puede reclutar al factor 2 asociado a TNF-R, o TRAF2, que se une a las proteínas 1 y 2 inhibidoras de la apoptosis celular y puede activar también la vía de las MAPK. TRADD puede también reclutar a la proteína de interacción con el receptor, RIP, y activar la vía del NF- $\kappa$ B (Figiel, 2008).

El TNF-R2, además de contar con capacidad de proteger a las neuronas contra la excitotoxicidad, también promueve la supervivencia neuronal así como la regeneración oligodendrocítica tras un daño (Marchetti et al., 2004).

La acción mediada a través de los dos tipos de receptores y la activación de las diferentes vías de señalización explican el papel neurotóxico o neuroprotector que puede tener el TNF- $\alpha$  (Baud y Karin, 2001; Shohami et al., 1999).

#### 1.4.2.2. Papel de la Interleuquina-1 $\beta$

La IL-1 $\beta$  pertenece a la familia de citoquinas pleiotrópicas que median numerosas actividades en el cerebro incluyendo neuroinflamación, fiebre, apetito, aprendizaje y memoria (Rothwell y Luheshi, 2000). Participa en la activación de la respuesta inmune y juega un papel importante en la iniciación y desarrollo de la cascada inflamatoria. La forma activa de IL-1 $\beta$  se produce a partir de la pro-IL-1 $\beta$  y se requiere la actividad de caspasa 1. La unión de IL-1 $\beta$  a su receptor induce la señalización a través de la vía de NF- $\kappa$ B o de las MAPKs (Davis et al., 2006). Como podemos comprobar, el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  activan el mismo conjunto de factores de transcripción, aunque median sus efectos a través de receptores de superficie celular diferentes y no relacionados.

La IL-1 $\beta$  puede ser inducida por diferentes ligandos entre los que se encuentran el LPS, los LT y otras citoquinas, y presenta una expresión incrementada en respuesta a estímulos infecciosos o daño. Los principales productores de IL-1 $\beta$  son los macrófagos, pero también la producen microglía, astrocitos, linfocitos T y B o neutrófilos, entre otros (Erikson et al., 1999).

Su unión al receptor IL-1R induce la producción de otras citoquinas inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  y el incremento de las enzimas PLA<sub>2</sub>, COX-2 e iNOS que producen AA, PGs y NO, respectivamente. Además, la IL-1 $\beta$  es capaz de autopotenciar su expresión como se evidencia en experimentos en los que la inyección de IL-1 $\beta$  produce incrementos de su propia producción en diferentes áreas del cerebro (Depino et al., 2005). Debido a este *feedback*, pequeños incrementos de interleuquina pueden producir potentes cambios en la neuroinflamación en cerebro. El papel clave de esta interleuquina en el cerebro se ha demostrado mediante estudios con ratones deficientes de receptor IL-1R1 en los que se ha observado una drástica atenuación de la activación de microglía y astrocitos y de la producción de IL-6 y COX-2 (Basu et al., 2002; Lin et al., 2006).

#### 1.4.2.3. Papel de la Interleuquina-6

La IL-6 presenta un papel esencial en la regulación de la inflamación, sirviendo de balance entre las respuestas pro y anti-inflamatorias. Se ha demostrado que en el cerebro participa en procesos tanto neurodegenerativos como neuroprotectores (Spooren et al., 2011). Se produce a nivel de sistema nervioso periférico y en el SNC, sobre todo en neuronas, microglía y astrocitos. Está relacionada con numerosas actividades como neurogénesis, control de peso, ingesta, estimulación del eje HPA, inducción de “*sickness behaviour*” y en aprendizaje y memoria, entre otras (Erta et al., 2012). Esta interleuquina se encuentra expresada al alza en neuroinflamación promoviendo la astrogliosis y la activación de la microglía. También se considera un activador de las respuestas de fase aguda. Se ha descrito su actividad en la resolución de la respuesta inmune y en el control del paso de la respuesta del sistema inmune innato al adquirido (Jones, 2005).

Esta interleuquina actúa a través de la unión a dos tipos de receptores, uno unido a membrana mIL-6R (de expresión limitada) y otro soluble sIL-6R (presente en todos los tejidos). Ambos pueden producir su señal interactuando con la glicoproteína soluble gp130, que desencadena la respuesta celular a través de la vía de las STAT y las MAPK.

### 1.4.3. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

#### 1.4.3.1. Factor Nuclear de Transcripción *kappa* B

Las proteínas del NF- $\kappa$ B pertenecen a una familia de factores de transcripción que regulan múltiples funciones relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis del cerebro, la regulación de la proliferación celular, la inmunidad innata y adaptativa, la respuesta inflamatoria, la plasticidad sináptica y las respuestas relacionadas con el estrés (Celeg, 2004). También son importantes en el proceso de restablecimiento celular que puede proteger a las células neuronales contra el estrés oxidativo, la apoptosis y la neurodegeneración tras un daño en cerebro (Mattson y Meffert, 2006), y se ha comprobado su actividad en los procesos de aprendizaje y memoria (Meffert y Baltimore, 2005).

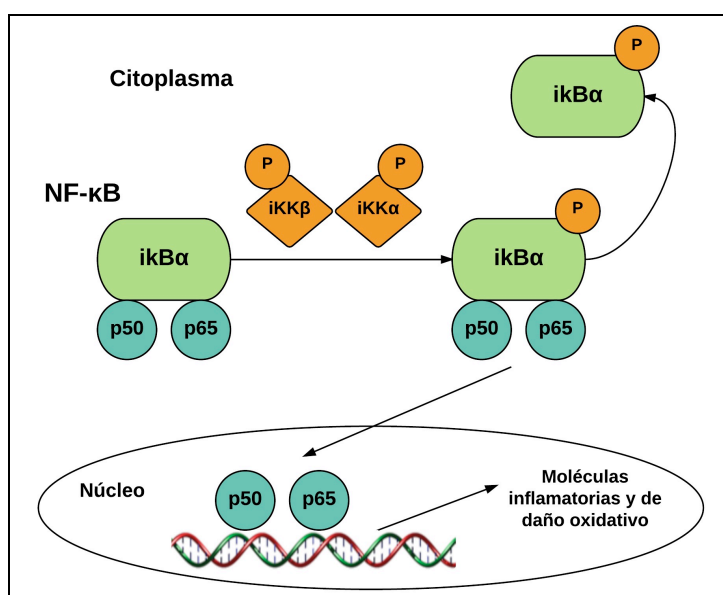
Este factor de transcripción tiene un papel dual en la respuesta inflamatoria. Por un lado, es capaz de regular la transcripción de numerosos genes relacionados con



inflamación y de proteínas de fase aguda y, por otro, puede tener propiedades anti-inflamatorias y neuroprotectoras (Lawrence, 2009).

La familia NF- $\kappa$ B está formada por cinco complejos de proteínas de unión al DNA: NF- $\kappa$ B1 (p50/p65), NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), RelA (p65), cRel y RelB. Durante la presente Tesis Doctoral, la mención a NF- $\kappa$ B se refiere al dímero NF $\kappa$ B1 (p50/p65). El NF- $\kappa$ B se encuentra ubicuamente expresado (en gran proporción en neuronas y células gliales) y su activación se produce en respuesta a diversos mecanismos como incremento de ROS, eicosanoides o citoquinas inflamatorias que comienzan las cascadas de señalización a través de varios receptores inmunes, como TLRs, IL-1R, TNF-R y receptores de antígeno.

En células no estimuladas el NF- $\kappa$ B se encuentra inactivo en el citoplasma. La activación está regulada por el  $\kappa$ B que se encuentran a su vez regulados por las kinasas iKK. Una vez que se produce la unión del ligando, los receptores inician la activación del complejo iKK que fosforilará al  $\kappa$ B produciéndose la liberación de NF- $\kappa$ B y la translocación al núcleo de su forma activa, el p65. Una vez en el núcleo el p65 se une a secuencias específicas de DNA situadas en el promotor de genes diana y facilita la expresión de numerosas proteínas implicadas en inflamación y daño oxidativo, como enzimas (PLA<sub>2</sub>, COX-2, NADPH oxidasa, iNOS, MMPs), citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), quimioquinas y otras proteínas como ICAM-1, VCAM-1 y E-selectinas.



**Figura 4.** Esquema de la activación y la traslocación al núcleo del NF- $\kappa$ B. La activación de NF- $\kappa$ B resulta de la fosforilación por i $\kappa$ B y de su degradación. El p65 penetra en el núcleo y se fija regiones promotoras específicas de los genes produciendo la expresión de moléculas inflamatorias y de daño oxidativo.

#### 1.4.3.2. Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas

Este otro grupo de factores de transcripción se encuentra implicado principalmente en el metabolismo lipídico y la neuroinflamación (Drew et al., 2006). También se encargan de modular la respuesta inmune. Existen tres isoformas de receptores activados por proliferación de peroxisomas (PPARs), codificadas por diferentes genes: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  y PPAR $\gamma$ . Éstas presentan similitudes en la estructura y formas de actuación molecular compartidas, pero realizan diferentes funciones debido a su afinidad por distintos ligandos y a su distribución específica en cada tejido. Las tres isoformas se encuentran, en mayor o menor medida, en muchos tejidos del cuerpo, incluyendo cerebro y sistema nervioso periférico (Moreno et al., 2004; Cimini et al., 2005). Se expresan en microglía, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (Heneka y Landreth, 2007). Los PPARs se encuentran involucrados en diferenciación y muerte celular y en inflamación y neurodegeneración. También se encargan de regular la homeostasis energética y metabólica. Los mecanismos de acción de los PPARs se han estudiado para desarrollar posibles tratamientos de enfermedades neuroinflamatorias. Los agonistas PPAR se han utilizado, terapéuticamente, en diversas enfermedades del SNC (Mandrekar-Colucci et al., 2013) y se han propuesto como tratamientos frente a drogas de abuso en estudios preclínicos (Le Foll et al., 2013; Bilbao et al., 2015).

Los PPARs son capaces de regular la transcripción de muchos genes diana. Tras unirse al ligando, los PPARs se unen al receptor X retinoide (RXR) formando el complejo PPAR/RXR. Este complejo es capaz de unirse a secuencias específicas del DNA llamadas elementos respuesta a proliferadores de peroxisoma (PPRE), situadas en regiones promotoras de los genes diana.

Este proceso dependiente de unión al DNA que controla la activación de la transcripción de genes diana, se conoce como activación transcripcional (trans-activación). Los PPARs también pueden reprimir la transcripción de ciertos genes (trans-represión). Este mecanismo explica la inhibición de la expresión de genes involucrados en la estimulación de la respuesta inflamatoria. En este proceso los PPARs interaccionan físicamente con otros factores de transcripción antagonizando varias vías de transducción de señales. Éste sería un mecanismo considerado independiente de la unión al DNA. Se han descrito tres formas principales de trans-represión de los complejos PPAR/RXR (Daynes y Jones, 2002). En la primera, los complejos PPAR/RXR competirían por co-activadores compartidos con otros factores de

transcripción, capturarían a los co-activadores inhibiendo la actividad de los otros factores de transcripción. La segunda consiste en un antagonismo mutal del receptor, o “cross-coupling”, basado en la capacidad del heterodímero PPAR/RXR de formar complejo con otros factores de transcripción (AP-1, NF- $\kappa$ B, STAT) produciendo una inhibición de la actividad de los factores que forman el complejo. La tercera forma de trans-represión implica la capacidad de PPAR/RXR de inhibir la fosforilación y activación de algunas moléculas de la cascada de las MAPK.

Las tres formas de PPAR han demostrado actuar en procesos inflamatorios. Los PPAR $\gamma$  realizan varias funciones inhibitorias de la inflamación, incluyendo la reducción de la actividad del NF- $\kappa$ B, la inhibición de la producción de moléculas pro-inflamatorias en linfocitos T, y la promoción de la expresión de mediadores anti-inflamatorios en células del sistema inmune innato. Los PPAR $\beta$  han demostrado recientemente capacidad de inhibición de la respuesta inflamatoria en células epiteliales, disminución de la expresión de mediadores pro-inflamatorios en macrófagos e inducción de la expresión de genes anti-inflamatorios y anti-oxidantes.

Los PPAR $\alpha$  pueden actuar como activadores transcripcionales en la expresión de genes que se encargan del mantenimiento de la homeostasis lipídica y del balance redox durante el catabolismo oxidativo de los ácidos grasos (Desvergne y Wahli, 1999). Sus efectos en la vía inflamatoria los producen a través de trans-represión de la expresión de ciertos genes. Existe una interacción entre los PPAR $\alpha$  y factores de transcripción que median la respuesta inflamatoria incluyendo las proteínas STAT, la AP-1 (compuesta por c-fos y c-jun), y el complejo NF- $\kappa$ B (compuesto por p50 y p65). Se comprueba que la interacción física del PPAR $\alpha$  con c-jun y p65 es capaz de inhibir la señal de la vía de AP-1 y NF- $\kappa$ B (Delerive et al., 1999). También se ha visto que PPAR $\alpha$  produce un incremento de la expresión de  $\kappa$ B $\alpha$  (Delerive et al., 2000), que mantendría al NF- $\kappa$ B inactivo en el citoplasma. Esto impediría la unión de este factor de transcripción al DNA produciendo, por tanto, un efecto anti-inflamatorio. Se comprobó que la regulación al alza de la expresión de  $\kappa$ B $\alpha$  no requiere del PPRE en el promotor de  $\kappa$ B $\alpha$  sino de sitios de elemento respuesta del NF- $\kappa$ B y del factor de transcripción de especificidad de proteínas llamado SP1 (Delerive et al., 2002), demostrándose así que PPAR $\alpha$  puede regular positivamente la transcripción de genes también en ausencia del elemento PPRE.

Los PPAR $\alpha$  son activados tras su unión a diversos ligandos naturales como los ácidos grasos y sus derivados, en especial las acilatanolamidas OEA y PEA (Fu et al., 2003), eicosanoides como LT y PG o sintéticos como los fibratos. La activación de este tipo de PPAR se ha visto que modula la expresión de genes del metabolismo lipídico y de la respuesta inmune e inflamatoria. El papel esencial que ejercen los PPAR $\alpha$  en inflamación se constató con ratones KO que presentaban una prolongada duración de la respuesta inflamatoria (Devchand et al., 1996). Estudios *in vitro* han demostrado que los PPAR $\alpha$  atenúan la respuesta inflamatoria en astrocitos (Xu et al., 2006) y microglía (Xu et al., 2005). La activación de los PPAR $\alpha$  también inhibe la producción de NO y la secreción de moléculas pro-inflamatorias.

#### 1.4.4. ENZIMAS PRO-INFLAMATORIAS Y PRODUCTOS DE SU ACTIVIDAD

##### 1.4.4.1. Ciclooxygenasas y Prostaglandinas

Las COX son enzimas que catalizan la conversión del AA en una serie de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y PGI<sub>2</sub>) y tromboxanos (TXA<sub>2</sub>), que reciben conjuntamente el nombre de prostanoïdes.

Existen tres isoformas de la enzima COX: COX-1, COX-2 y COX-3. La isoforma COX-3 ha sido identificada en perro (Chandrasekharan et al., 2002) y se considera una variante del mRNA de la COX-1.

La COX-1 se expresa de forma constitutiva bajo condiciones normales en varios tejidos y media en la regulación de actividades fisiológicas (Yasojima et al., 1999). Se ha observado también que la expresión de COX-1 está involucrada en la regulación de la respuesta inflamatoria mediante la producción de PGE<sub>2</sub> y la regulación del eje HPA (García-Bueno et al., 2009).

La COX-2 se encuentra en niveles muy bajos en condiciones normales pero su expresión se ve inducida rápidamente por una gran variedad de estímulos como citoquinas, factores de crecimiento, endotoxinas bacterianas, mecanismos oxidativos y otra serie de mediadores inflamatorios. En el SNC, por ejemplo, está implicada en la transmisión y la plasticidad neuronal (Yamagata et al., 1993; Kaufmann et al., 1996). La región promotora del gen de COX-2 contiene múltiples elementos reguladores de varios factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B y la AP-1 en varios tipos celulares.

Se reconoce un importante papel de COX-2 en el desarrollo de la neuroinflamación y en enfermedades neurodegenerativas (Minghetti, 2004), aunque algunos estudios experimentales indican que la delección o la inhibición completa de COX-2 puede llegar también a agravar la respuesta inflamatoria (Choi et al., 2009).

Las PG son lípidos eicosanoides derivados del AA que realizan funciones de mantenimiento homeostático y median en mecanismos patogénicos de la respuesta inflamatoria. Estas prostaglandinas pueden desarrollar una actividad tanto anti- como pro-inflamatoria. Estas moléculas actúan en varias enfermedades neurodegenerativas donde pueden tener un papel dual en la promoción y la resolución de la inflamación (Lima et al., 2012). El incremento de la producción de prostanoïdes en cantidades tóxicas por la actividad de COX-2 se ha relacionado con procesos patológicos de componente inflamatorio (Seibert et al., 1995).

En la biosíntesis de las PG, un estímulo dependiente de la PLA<sub>2</sub> separa el AA de la membrana de fosfolípidos, y a partir de él la síntesis de PG se lleva a cabo por la acción de varias enzimas. Estas enzimas serían COX y PG sintasas específicas de cada PG.

Se han caracterizado dos tipos de prostaglandinas E sintasas (PGES): las microsomales (mPGES-1 y mPGES-2) y la citosólica (cPGES). La cPGES y la mPGES-2 son enzimas constitutivas, mientras que la mPGES-1 es una enzima inducible, que se encuentra expresada al alza en respuesta a diversos estímulos inflamatorios. Esta enzima es capaz de actuar conjuntamente con COX-2 para la producción de la PGE<sub>2</sub>.

La PGE<sub>2</sub> actúa a través de los receptores de la familia rodopsina acoplados a proteínas G, llamados receptores EP, pero también puede actuar a través de los PPAR. La PGE<sub>2</sub> tiene un papel fundamental en la neuroinflamación. En el lugar del daño, se ha observado que PGE<sub>2</sub> está involucrada en la modulación de la respuesta inmune a través de acciones pro-inflamatorias asociadas a activación microglial. PGE<sub>2</sub> también tiene actividad neurotóxica y puede producir muerte celular por apoptosis (Takadera et al., 2002). Aunque algunos estudios con modelos de excitotoxicidad e isquemia cerebral han demostrado un papel neuroprotector del receptor EP2 (McCullough et al., 2004; Liu et al., 2005). La inhibición farmacológica del receptor o su delección genética revierten sus efectos protectores en una forma dependiente de cAMP y producen el incremento de la zona infartada.

#### 1.4.4.2. Óxido Nítrico Sintasa inducible y Óxido Nítrico

Existen tres isoformas de la enzima NOS: la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS). iNOS es la más relacionada con neuroinflamación ya que produce cantidades de NO muy superiores a las que pueden producir las otras dos isoformas. La iNOS se caracteriza por su independencia del calcio para sintetizar NO y citrulina a partir de L-arginina.

El NO puede mediar diversas actividades fisiológicas como actividad inmune de macrófagos, recaptación de neurotransmisores, neurodesarrollo y plasticidad sináptica. Sin embargo, el incremento de su producción tras un estímulo producirá consecuencias patológicas como neurotoxicidad y neuroinflamación, es por ello que elevadas concentraciones se relacionan con enfermedades neurodegenerativas o estrés.

La NOS puede producirse en macrófagos, neuronas, células endoteliales, astrocitos y microglía, pero son estos dos últimos los que se consideran la fuente principal de NO en el SNC durante la neuroinflamación. La activación de iNOS se puede producir por numerosos estímulos como infecciones, citoquinas y quimioquinas o neurotoxinas. La regulación de su expresión está mediada por la vía de las MAPKs, por las ROS y varios factores de transcripción como STAT, NF- $\kappa$ B y AP-1 (Saha y Pahan, 2006). Se ha comprobado que la activación de NF- $\kappa$ B es esencial en la expresión de iNOS (Madrigal et al., 2001).

Durante la neuroinflamación la expresión al alza de iNOS producirá grandes cantidades de NO que reaccionarán con otras especies reactivas como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) formando peróxido de nitrito ( $ONOO^-$ ), responsable principal del estrés oxidativo (Pacher et al., 2007). Estas moléculas realizan el proceso citotóxico llamado peroxidación lipídica:  $ONOO^-$  puede producir muerte celular al atacar y desestabilizar la estructura de las membranas plasmáticas celulares y liberar productos tóxicos procedentes de la degradación de fosfolípidos de membrana como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE).

#### 1.4.5. EL ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se produce como consecuencia de la ruptura del balance entre los niveles de especies reactivas de oxígeno/especies reactivas de nitrógeno (ROS/RNS) y antioxidantes. Niveles basales de estas especies reactivas son mediadores de

supervivencia celular, proliferación, diferenciación y apoptosis (Dröge, 2002). Pero la excesiva producción de ROS desencadenará estrés oxidativo produciendo daño neuronal e inflamación y contribuyendo al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, neurotraumáticas y neuropsiquiátricas (Kovacic y Somanathan, 2012).

Muchas enzimas inflamatorias como MMP-9, PLA2, COX-2, iNOS y moléculas de adhesión están asociadas a estrés oxidativo mediante la generación de ROS. Las ROS son moléculas de señalización clave para la respuesta inflamatoria en el SNC a través de la activación de factores de transcripción sensibles a redox, incluyendo el NF- $\kappa$ B y la AP-1 (Valko et al., 2007). La producción de ROS en células neuronales promueve la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo donde interacciona con elementos que facilitan la expresión de enzimas pro-inflamatorias, citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión. Se ha observado que la habilidad de unión del NF- $\kappa$ B al DNA modula el estado redox de la célula (Nishi et al., 2002).

Existen diferentes fenómenos que dirigen el estrés oxidativo y/o nitrosativo en el cerebro. Los radicales libres mitocondriales y la activación de la NADH oxidasa son los mecanismos principales relacionados con la neurodegeneración. Bajo condiciones fisiológicas el 1% del flujo de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial producen la formación de un peligroso producto, el  $O_2^{\cdot-}$ . Pero durante la neuroinflamación se incrementan drásticamente los niveles de este producto. Éste se transforma rápidamente en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por la enzima superóxido dismutasa y el  $H_2O_2$  reacciona con metales de transición reducidos produciendo radicales hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) altamente reactivos. Adicionalmente, el  $O_2^{\cdot-}$  reacciona con el NO para generar el ONOO $^-$  que reacciona con dióxido de carbono causando daño en proteínas a través de la formación de complejos de nitrotirosina y peroxidación de lípidos de membrana.

## 1.5. MARCADORES DE DAÑO CELULAR

### 1.5.1. LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y LAS CASPASAS

Las ROS/NOS pueden unirse a varios sustratos en la célula causando peroxidación en proteínas, DNA, RNA o lípidos. La peroxidación lipídica en el cerebro, a partir de ácidos grasos poliinsaturados como el AA, concluye con la formación de dos subproductos el MDA y el 4-HNE. Estas moléculas realizan su función gracias a la

capacidad que poseen para unirse a otras biomoléculas como aminoácidos, proteínas o ácidos nucleicos pudiendo entonces participar en actividades de citotoxicidad, proliferación celular o regulación de la expresión de factores de transcripción (Ayala et al., 2014). También causan disfunción endotelial y cambios en neuroinflamación por inducción de enzimas y citoquinas. Se ha demostrado que elevados niveles de productos de la peroxidación lipídica se encuentran ligados a varios procesos neuropatológicos.

Los aldehídos reactivos de los productos de la peroxidación lipídica, especialmente del 4-HNE, son los que pueden producir necrosis o apoptosis en las células. Este proceso citotóxico lo realizan modulando diversos factores de transcripción o vías de señalización entre las que se incluyen las caspasas.

La apoptosis puede seguir una vía intrínseca o extrínseca. La extrínseca implica al TNF- $\alpha$  y los receptores de muerte de la superficie celular. La intrínseca involucra varios estímulos no mediados por receptores. Las caspasas se encuentran presentes en forma inactiva y se activan por un mecanismo de escisión. La caspasa 8 comienza a desensamblarse en respuesta a ligandos inductores de la apoptosis. La caspasa 8 se considera una caspasa iniciadora de la señal apoptótica y es la que activa a la caspasa 3 por escisión proteolítica. La caspasa 3 activada (considerada ejecutora de la apoptosis) puede entonces romper proteínas celulares vitales produciendo la muerte de la célula. (Elmore, 2007). En el caso del 4-HNE se ha demostrado que mediante su unión a proteínas y la formación de complejos moleculares, activaría el estrés oxidativo y desencadenaría la vía de las caspasas apoptóticas mencionada (Liu et al., 2000).

#### 1.5.2. LAS PROTEÍNAS DEL GRUPO CAJA 1 DE ALTA MOVILIDAD (HMGB1)

Como consecuencia del daño celular se produce la liberación de patrones moleculares endógenos de respuesta al daño tisular, DAMPs, desde el citosol (como las proteínas S100 o las proteínas de choque térmico), o desde el núcleo (las HMGB1). Las HMGB1 son proteínas nucleares que actúan estabilizando la formación del nucleosoma y facilitando la unión de proteínas reguladoras al DNA, controlando así la expresión de varios genes. Cuando la respuesta inflamatoria produce daño o muerte celular las HMGB1 pueden ser excretadas al espacio extracelular de dos maneras: de forma activa por los macrófagos, las células dendríticas y las células “*natural killer*” tras la activación por endotoxinas o citoquinas pro-inflamatorias, y de forma pasiva por células



necróticas (Lotze y Tracey, 2005). Las HMGB1 extracelulares actúan activando las células endoteliales e incrementando la migración celular y la respuesta inflamatoria. Las HMGB1 actúan principalmente a través de los receptores para compuestos de glicosilación avanzada, pero también a través de los TLR4 y TLR2. Después de la activación de los receptores, las HMGB1 producen la transducción de la señal mediante la vía NF- $\kappa$ B produciendo la transcripción de genes pro-inflamatorios. La señal de daño HMGB1/TLR4 se ha asociado a activación neuroinmune producida por endotoxinas y por alcohol (Qin et al., 2008).

#### 1.6. NEUROINFLAMACIÓN Y ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La neuroinflamación juega un papel importante en la etiología y desarrollo de procesos neurodegenerativos, desórdenes psiquiátricos, depresión, estrés y adicción. Debido a la implicación de la neuroinflamación en estos procesos patológicos se han estudiado diversos tratamientos anti-inflamatorios tanto para prevenir como para ralentizar la progresión de estas enfermedades.

Se ha observado un papel fundamental de la neuroinflamación en diversas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Hensley, 2010), Parkinson (Hirsch et al., 2012) o esquizofrenia (Monji et al., 2013) entre otras. Esta neuroinflamación, como hemos visto, se caracteriza por una serie de alteraciones en el SNC entre las que destacan la activación de las células del sistema inmune innato (principalmente microglía y astrocitos), el incremento de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), de enzimas (COX-2, iNOS) y de factores de transcripción inflamatorios (NF- $\kappa$ B) y la producción de daño oxidativo. En muchas de estas enfermedades se produce muerte neuronal debido a esa respuesta neuroinflamatoria incontrolada. Estas alteraciones se han observado tanto en personas que sufren la enfermedad neurodegenerativa como en modelos animales. Se propone que estas patologías producen daño mediante una interconexión entre citotoxicidad, inflamación, estrés oxidativo y apoptosis (Farooqui et al., 2007).

También existen evidencias de que los procesos inflamatorios y neurodegenerativos juegan un papel muy importante en la depresión (Maes et al., 2009). Los síntomas del llamado "sickness behavior" (explicado detalladamente en el punto 3.3 de esta Tesis Doctoral) que se producen en respuesta a un daño o enfermedad son similares a los que suceden en la depresión. Varios factores indican una relación entre inflamación y

depresión: la depresión es comórbida con enfermedades inflamatorias (cáncer, diabetes, obesidad y enfermedades autoinmunes), individuos con desórdenes depresivos presentan elevados niveles de marcadores inflamatorios y la inhibición de la vía inflamatoria se ha observado que mejora el estado de ánimo (Rosenblat et al., 2014). Además, esos niveles de marcadores inflamatorios elevados asociados con los síntomas de la depresión influyen en la severidad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

El estrés también altera la función inmunológica e induce la respuesta inflamatoria a través de la producción de mediadores pro-inflamatorios. Tanto el estrés agudo como el crónico se asocian con incrementos de citoquinas pro-inflamatorias y disminución de las anti-inflamatorias. A nivel génico el incremento de la transcripción de genes pro-inflamatorios ocurre principalmente como resultado del aumento de la activación del NF- $\kappa$ B. Una posible explicación de la alteración inmunológica es que la respuesta al estrés se encuentra mediada por los GC. Los GC en niveles basales tienen actividad anti-inflamatoria pero en situaciones patológicas relacionadas con el estrés se encuentran elevados y podrían causar neuroinflamación (Garcia-Bueno et al., 2008). Este efecto implicaría un *feedback* en los receptores de los GC.

Varios estudios sugieren que podría existir una relación entre neuroinflamación y adicción. Se ha comprobado que las drogas de abuso producen neuroinflamación y neurodegeneración. Existen evidencias de que el consumo de drogas de abuso está relacionado con la activación del sistema inmune (Orio et al., 2004; 2009). Además, los efectos perjudiciales del abuso de estas sustancias en el cerebro se deben en parte a la neuroinflamación que desencadenan (Clark et al., 2013). También se ha encontrado esta relación entre neuroinflamación y adicción en el caso del consumo de alcohol (Crews et al., 2011), que será tratado en el punto 4.4 de esta Tesis Doctoral. Debido a los resultados de los estudios que sugieren la participación del sistema inmune innato en la etiología y mantenimiento de la adicción, se han propuesto nuevas líneas de dianas terapéuticas de tratamientos frente a la adicción que se centran en esa respuesta del sistema inmune innato y en la neuroinflamación. Una de las dianas terapéuticas farmacológicas propuestas frente a la adicción son los lípidos transmisores (Orio et al., 2013), que serán comentados en el punto 2 de esta Tesis Doctoral.

## **2. LAS ACILETANOLAMIDAS**

### **2.1. EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y LAS ACILETANOLAMIDAS**

El sistema endocannabinoide es capaz de regular una gran variedad de funciones fisiológicas en el organismo como el desarrollo neuronal, la función inmune, el metabolismo, la plasticidad sináptica y el estado emocional. Entre los elementos que forman parte del sistema endocannabinoide se encuentran una serie de ligandos endógenos bioactivos, receptores específicos y mecanismos de síntesis y degradación. Los endocannabinoides se encuentran presentes en todos los tejidos, son sintetizados a demanda y no se encuentran acumulados en el organismo en vesículas de reserva. Sus niveles endógenos están regulados directamente por enzimas que se encargan de su síntesis y de su degradación. En respuesta a estímulos celulares los endocannabinoides se generan desde fosfolípidos de membrana por acción de hidrolasas específicas o por combinación de hidrolasas y aciltransferasas. Después de actuar como ligandos en sus receptores estas moléculas son rápidamente recaptadas y degradadas.

Dentro de los lípidos bioactivos que forman parte del sistema endocannabinoide encontramos ligandos endógenos derivados del AA, algunos de los cuales son la anandamina (AEA), el 2-araquidonil glicerol (2-AG), el 2-araquidonil gliceril éter y la virodamina. Como receptores del sistema endocannabinoide destacan dos pertenecientes a la familia de GPCR, el CB<sub>1</sub> y el CB<sub>2</sub>. El CB<sub>1</sub> es el GPCR más abundante en el SNC, localizándose en neuronas y células gliales principalmente, aunque también se expresa en tejidos periféricos. El CB<sub>2</sub> se expresa principalmente en el sistema inmune (en linfocitos B, monocitos, neutrófilos y linfocitos T) aunque también puede encontrarse en células del SNC. Además de estos receptores se han identificado otros a través de los cuales los endocannabinoides pueden ejercer sus acciones, entre los que se encuentran el receptor de vanilloides tipo 1 (TRPV1), que sirve como diana para la AEA y sus derivados, los GPCR: GPR55 y GPR119, o los receptores nucleares PPAR, capaces de reconocer varios ligandos endocannabinoides.

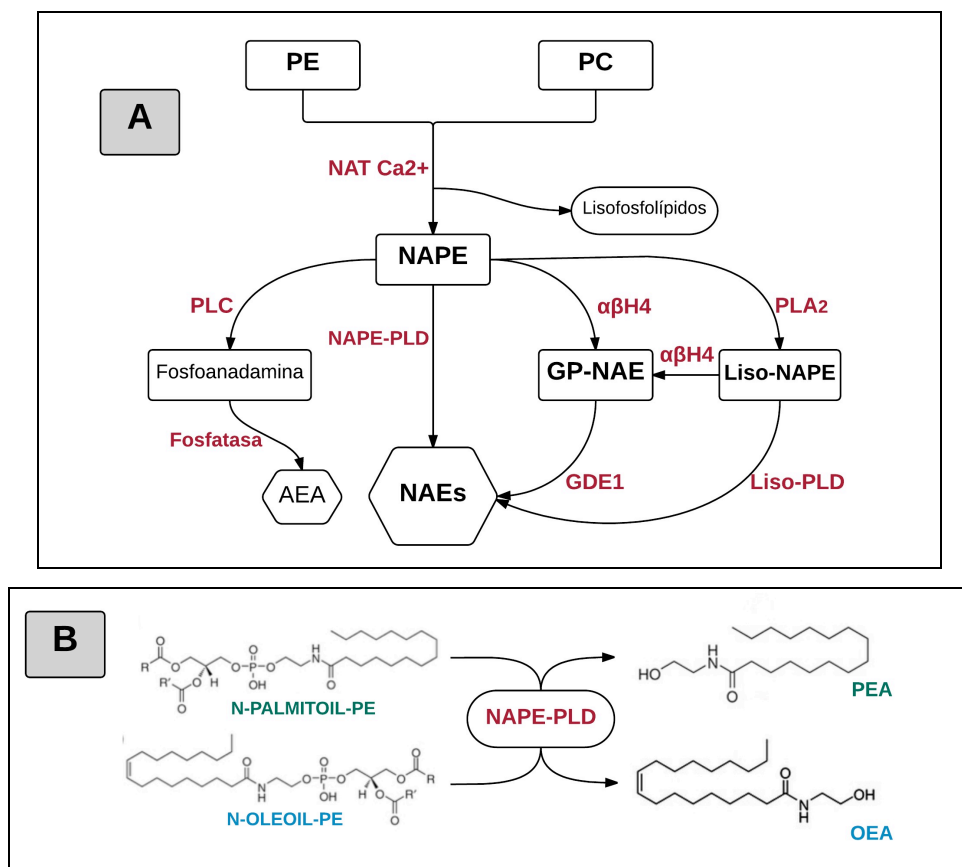
La familia de las N-aciletanolamidas (NAEs), a la que pertenece la AEA, cuenta con otras dos moléculas bioactivas: la oleoiletanolamida (OEA) y la palmitoiletanolamida (PEA) (Matias et al., 2007), que han demostrado actividad en la respuesta inmune y en la inflamación. El papel de la AEA y de los receptores a través de los cuales ejerce

principalmente sus acciones, el CB<sub>1</sub> y el CB<sub>2</sub>, ha sido ampliamente estudiado en numerosas patologías y en la neuroinflamación (DiMarzo, 2008). Mientras que la AEA se encuentra presente en concentraciones bajas en el organismo, otras NAEs como OEA y PEA son más abundantes. Ni la OEA ni la PEA actúan a través de la activación de receptores cannabinoides, sino principalmente a través de los PPAR $\alpha$  (Rodríguez de Fonseca et al., 2001; LoVerne et al., 2005). Aunque las dianas moleculares mediante las cuales actúan difieren de las de la AEA, estas NAEs comparten algunas vías biosintéticas y catabólicas con la AEA.

## 2.2. BIOSÍNTESIS DE LAS ACILETANOLAMIDAS

Las NAEs, etanolamidas de varios ácidos grasos de cadena larga, son lípidos bioactivos formados a partir de glicerofosfolípidos de membrana a través de vías de transacilación-fosfodiesterasas. Se han propuesto varias vías de síntesis de NAEs (**Figura 5**). La más estudiada es la que se realiza a través de la actividad de una N-aciltransferasa (NAT) dependiente de Ca<sup>2+</sup> y AMPc que transfiere un ácido graso desde la posición sn-1 de la fosfatidilcolina (PC) al grupo amino libre de la fosfatidiletanolamina (PE) formando así el precursor N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE). Este NAPE tras la transformación por una fosfolipasa D específica de NAPE (NAPE-PLD) produce el incremento de NAEs (Cadas et al., 1996).

En un estudio se identifica, primero en rata y más tarde en ratón y humano, una actividad enzimática, la N-acil transferasa o NAT que es independiente de Ca<sup>2+</sup>, llamada RLP-1 o iNAT (Jin et al., 2007), que funcionaría como una N-aciltransferasa de PE sintetizando AEA y otras NAEs.



**Figura 5. A:** Diferentes rutas propuestas para la síntesis de las NAEs (enzimas implicadas en color rojo). **B:** Estructura química de los precursores y de las moléculas PEA y OEA.

La PEA y la OEA, al igual que la AEA, son sintetizadas a partir de diferentes precursores por acción de la enzima NAPE-PLD (Okamoto et al., 2004). Aunque tras observarse que los ratones KO para la enzima NAPE-PLD mostraban niveles similares de AEA que los WT, se plantea que esta enzima no sería la única responsable de su síntesis.

Se han propuesto otras vías de síntesis para la formación de NAEs. Una de ellas se realiza a través de la actividad de una lipasa NAPE selectiva llamada  $\alpha\beta$ Hidrolasa-4( $\alpha\beta$ H4) (Simon y Cravatt, 2006). Esta enzima se encuentra muy expresada en sistema nervioso y realizaría la doble O-deacilación de NAEs para formar glicerofosfo- NAEs (GP-NAEs) (también llamadas Lisofofofo-NAEs) que tras la acción de otras fosfodiesterasas se convertirían en NAEs. Más tarde se identifica la glicerofosfodiesterasa GDE1 como una enzima de membrana que realizaría actividad fosfodiesterasa GP-NAE (Simon y Cravatt, 2008).

Otro mecanismo adicional de síntesis propuesto sería la hidrólisis de NAPE a N-acil-liso-PE (Lyso-NAPE) catalizada por la enzima PLA<sub>2</sub>, seguida de ruptura de Lyso-NAPE a NAEs, catalizada por una lisofosfolipasa D (liso- PLD) (Sun et al., 2004).

En otra posible vía estaría implicada la actividad de una fosfolipasa-C (PLC) (vía comprobada en la síntesis de AEA pero no en el resto de NAEs) (Liu et al., 2006).

### 2.3. CATABOLISMO DE LAS ACILETANOLAMIDAS

En relación con las vías catabólicas de los endocannabinoides, se han descrito cuatro enzimas implicadas en la finalización de la señal: la ácido graso aminohidrolasa-1 (FAAH-1), la ácido graso aminohidrolasa-2 (FAAH-2), N-aciletanolamina hidrolizante ácido amidasa (NAAA) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL).

La NAAA es una enzima lisosomal con actividad óptima a pH ácido. Puede metabolizar PEA y OEA a sus correspondientes ácidos grasos y etanolamina. NAAA hidroliza PEA mucho más rápidamente que cualquier otra NAE, especialmente en presencia de detergentes no iónicos (Ueda et al., 2001; Tsuboi et al., 2005). Se expresa principalmente en varios tejidos periféricos y en macrófagos, pero se encuentra en niveles bajos en cerebro y no se considera tan importante en la degradación de los endocannabinoides como la FAAH.

La FAAH es una enzima unida a membrana que pertenece a la familia de las serinas hidrolasas. Se ha comprobado que en humanos se expresan ambas formas de la enzima FAAH, pero en roedores sólo se encuentra expresada la FAAH-1 (Wei et al., 2006). Está ampliamente distribuida por todos los tejidos de los mamíferos con elevadas concentraciones en cerebro e hígado (Cravatt y Lichtman, 2002). AEA y otras NAEs son principalmente hidrolizadas por la FAAH a través de la ruptura hidrolítica del enlace amida para formar ácidos grasos y etanolamidas (Ueda, 2002). La desactivación farmacológica de FAAH incrementa los niveles endógenos de etanolamidas y produce fenotipos analgésicos, anxiolíticos, antidepresivos y anti-inflamatorios (Ahn et al., 2008).

La OEA y la PEA son capaces de incrementar los niveles de AEA mediante un efecto conocido con el nombre de “entourage effect” (Jonsson et al., 2001). Estas NAEs actuarían competitivamente por el sitio catalítico de la enzima FAAH disminuyendo la degradación de AEA. También puede producirse este efecto mediante competición de

las distintas NAEs por los receptores a través de los que realizan su actividad. Este sería el caso de los receptores TRPV1 que pueden considerarse un punto de interacción entre AEA y otras NAEs. La PEA y la OEA potencian los efectos de AEA en los TRPV1. La OEA, pero no la PEA, es agonista de los TRPV1 con igual potencia que la AEA. Sin embargo, se propone la posibilidad de una actuación conjunta de AEA, PEA y OEA para activar directa o indirectamente los receptores TRPV1 (Ho et al., 2008).

Se han propuesto, alternativamente, otras enzimas como COX-2, LOX y citocromo p450 capaces de inactivar esas aciletanolamidas por oxigenación (Rouzer y Marnett, 2011) generando otra serie de moléculas bioactivas, entre otras, prostaglandinas-etanolamidas y ésteres de glicerol.

#### 2.4. LA ANANDAMIDA Y LA INFLAMACIÓN

La AEA fue aislada y descrita estructuralmente, por primera vez, en 1992 por Devane y colaboradores (Devane et al., 1992). Es un lípido endógeno de señalización que se une a receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> y produce efectos farmacológicos similares a los cannabinoides. Se ha comprobado que la AEA es capaz de activar los receptores TRPV1 (Zygmunt et al., 1999) y los PPAR $\gamma$  (Bouaboula et al., 2005). También se ha visto que la AEA podría ser un agonista parcial de los receptores GPR55 (Sharir et al., 2012). La AEA está implicada en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos incluyendo adicción a drogas de abuso, obesidad y desarrollo embrionario. También se ha comprobado su actividad en procesos inflamatorios y en neurodegeneración. La síntesis y degradación de AEA modifica los niveles de AA, que es un precursor clave de numerosos componentes inflamatorios y nociceptivos incluyendo prostanoides y LT. En concreto, el incremento de AA inducido por AEA puede producir la formación de eicosanoides con acciones inmunes e inflamatorias como la PGE<sub>2</sub>.

El incremento de los niveles de AEA, bien directamente o por inhibición de su recaptura o degradación, se ha visto que reduce los niveles de citoquinas proinflamatorias y mediadores inflamatorios producidos en respuesta a una estimulación inmune en varios estudios *in vitro*. De esta forma se ha comprobado que la AEA disminuye el incremento de NO e IL-6 en macrófagos inducido por LPS, en una forma dependiente de concentración (Chang et al., 2001). En cultivos de microglía la AEA inhibe el incremento de TNF- $\alpha$  inducido por LPS también en una forma dependiente de

concentración (Facchinetti et al., 2003). En otros estudios se utilizan inhibidores de la enzima FAAH en cultivos de microglía, observándose una disminución de la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS y por tanto de los mediadores PGE<sub>2</sub> e NO (Tham et al., 2007). En cultivo de astrocitos se comprueba que mediante la inhibición de la recaptación de la AEA, ésta es capaz de promover la respuesta anti-inflamatoria tras la estimulación causada por LPS (Ortega-Gutierrez et al., 2005). En este caso se observa una disminución de la expresión de iNOS, y de los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e NO, aunque también se apunta un ligero incremento de los niveles de IL-6.

La evidencia *in vivo* del papel inmunomodulatorio del incremento de la AEA se ha conseguido tras la administración sistémica de una endotoxina bacteriana. Tanto la inhibición de la recaptación de la AEA como la inhibición de la FAAH, reducen el incremento en los niveles de interleuquinas en plasma inducido por el LPS (Roche et al., 2008). Se ha observado que la inhibición de la enzima FAAH y los consiguientes incrementos de AEA, en varios modelos animales, tienen una función clave en el tratamiento del dolor inflamatorio y neuropático (Salaga et al., 2014; Roques et al., 2012), y en otras enfermedades con claro componente inflamatorio como la esclerosis múltiple (Jean-Gilles et al., 2009).

El sistema endocannabinoide está muy activado durante la inflamación del SNC y protege a las neuronas del daño ejerciendo funciones de neuroprotección. Los niveles de AEA incrementados en tejido cerebral dañado, regularían la expresión de la MAPK1 en células microgliales a través de la activación de los receptores cannabinoides (Eljaschewitsch et al., 2006). La modulación de la señal de la vía de las MAPK produce un *feedback* negativo en el sistema inmune para reprimir la respuesta inflamatoria y limitar las consecuencias neurodegenerativas que pueda causar ese daño cerebral.

## 2.5. LA PALMITOILETANOLAMIDA Y LA INFLAMACIÓN

La PEA o N-(2-hidroxietil)-hexadecanamida fue identificada en 1965 por Long y Martin (Long y Martin, 1965). Se encuentra presente en cerebro, hígado y músculo esquelético. Se ha comprobado que reduce las reacciones alérgicas y la inflamación en animales y que tiene capacidad para inhibir la inflamación periférica. Estas acciones están acompañadas de cambios en la producción de NO: la PEA inhibe la producción de NO en macrófagos estimulados con LPS (Ross et al., 2000). En cuanto a la expresión de



las enzimas pro-inflamatorias COX-2 e iNOS, la PEA reduce los incrementos de estas enzimas en un modelo de inflamación aguda en rata (Costa et al., 2002).

La PEA participa en los mecanismos de regulación endógenos que se activan en el organismo tras diferentes tipos de daños tisulares o la estimulación de fibras nociceptivas o de la respuesta inflamatoria. La PEA es capaz de producir analgesia en modelos de dolor visceral, neuropático e inflamatorio. La PEA reduce la hiperalgesia provocada por el factor de crecimiento nervioso y disminuye la infiltración de neutrófilos (Farquhar-Smith y Rice, 2003).

Aunque la PEA media sus efectos, principalmente, a través de los receptores PPAR $\alpha$ , también se ha estudiado su actividad a través de los TRPV1 (Ho et al., 2008) y se ha comprobado que es un agonista potente y selectivo del receptor GPR55 (Ryberg et al., 2007). Inicialmente se sugirió que la PEA era ligando endógeno de CB<sub>2</sub> (Facci et al., 1995), pero estudios posteriores demostraron que la PEA tiene muy baja afinidad por este receptor (Griffin et al., 2000). Aunque un estudio muestra que en presencia de antagonistas de CB<sub>2</sub> la PEA pierde su capacidad analgésica (Calignano et al., 2001), por lo que la PEA podría realizar algunas funciones a través de este receptor o potenciar directamente la acción de otros endocannabinoides que lo activen.

Las propiedades anti-inflamatorias de la PEA ocurren por activación de los PPAR $\alpha$  (LoVerme et al., 2005). La PEA ha demostrado realizar acciones anti-inflamatorias en ratones control que no se observan en los ratones deficientes para el receptor PPAR $\alpha$ . Si PPAR $\alpha$  media los efectos anti-inflamatorios de la PEA, esta etanolamida puede servir al igual que la OEA de ligando endógeno del receptor. Se ha comprobado esta actividad anti-inflamatoria de la PEA en varios modelos de edema inducido y de isquemia. La administración aguda de PEA disminuye el incremento de enzimas pro-inflamatorias (COX-2 e iNOS) en un modelo de edema (D'Agostino et al., 2007), acción que realiza a través de los PPAR $\alpha$ . En un modelo de isquemia cerebral la PEA ha demostrado capacidad para regular la expresión de mediadores inflamatorios y para reducir el área de la zona infartada (Ahmad et al., 2012b).

La PEA ha demostrado ejercer efectos neuroprotectores también a través de los PPAR $\alpha$  (Koch et al., 2011). Ésta aciletanolamida muestra actividad neuroprotectora mediante la disminución del edema cerebral, la regulación de la inflamación y la limitación de la muerte celular (Esposito y Cuzzocrea, 2013). La administración de PEA ha demostrado tener efectos beneficiosos en el SNC tras un daño cerebral traumático o

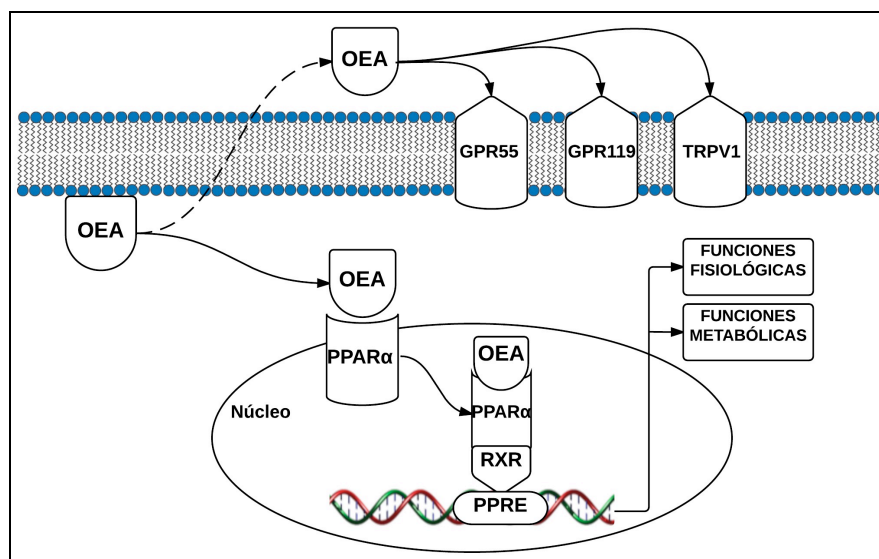
en patologías relacionadas con la edad. La PEA es capaz de limitar la zona dañada, reducir la pérdida de tejido neuronal y recuperar algunas de las funciones perdidas.

## 2.6. LA OLEOILETANOLAMIDA

La OEA es el análogo monoinsaturado de la AEA que, a diferencia de esta, no actúa vía activación de los receptores cannabinoides. La OEA fue descrita como factor de saciedad (Rodríguez de Fonseca et al., 2001), función que realiza a través de los PPAR $\alpha$ , considerándose, por tanto, la OEA agonista endógeno de estos receptores (Fu et al., 2003; Guzmán et al., 2004). Además, se ha comprobado que la OEA puede ser ligando endógeno del receptor GPR119 (Overton et al., 2006), a través del cual mediaría, al menos en parte, las actividades de regulación de la ingesta y el peso corporal. Por otra parte la OEA, actuando a través de los receptores TRPV1 (Ahern, 2003; Wang et al., 2005), puede excitar a neuronas sensitivas y en este caso incrementar la sensibilidad visceral al dolor. La OEA también es capaz de activar los receptores GPR55 pero con menor potencia que la PEA (Brown, 2007a).

La OEA, a través de los PPAR $\alpha$ , realiza principalmente funciones metabólicas como la regulación del metabolismo lipídico, y funciones fisiológicas como la modulación de la ingesta y el peso corporal, funciones neuroprotectoras, analgésicas y ansiolíticas y de regulación de la conducta dirigida a la obtención de recompensa (Orio et al., 2013).

Tras la unión de la OEA al PPAR $\alpha$ , éste heterodimeriza con el receptor RXR, para después unirse a secuencias específicas de DNA llamadas PPRE. Estos PPRE modulan la transcripción de genes diana que controlan una amplia variedad de actividades metabólicas y fisiológicas (**Figura 6**).



**Figura 6.** Esquema de la actuación de la OEA a través de la unión a sus diferentes receptores. Mediante la activación de los receptores nucleares PPAR $\alpha$  y su unión a las secuencias PPRE del DNA, la OEA produce la expresión de genes involucrados en actividades fisiológicas y metabólicas.

Entre los genes regulados por los PPAR $\alpha$  que participan en el metabolismo de los ácidos grasos encontramos los de la traslocasa de ácido graso, los de la proteína transportadora de ácido graso (Motojima et al., 1998) y también los de expresión de los propios PPARs (Escher et al., 2001). Estos receptores nucleares también participan en la expresión de genes de las proteínas desacoplantes relacionadas con la oxidación lipídica y el balance energético (Villarroya et al., 2007). Varios estudios han comprobado que la OEA es capaz de inducir la expresión de estos genes relacionados con el metabolismo lipídico y la utilización de los ácidos grasos.

En cuanto a las funciones metabólicas, la administración sistémica de OEA ha demostrado reducir la ingesta de comida y el peso corporal. La PEA causa los mismos efectos, pero de forma más débil, y la AEA y el ácido oleico no muestran esos efectos (Rodríguez de Fonseca et al., 2001). La capacidad anoréxica de la OEA tiene origen periférico, ya que este efecto no se observa cuando la OEA se administra intracerebroventricularmente. Además las fibras periféricas sensitivas tienen un papel fundamental en esta actividad de la OEA. La administración de OEA produce saciedad y reduce la ganancia de peso corporal en ratones control, pero no en los carentes de PPAR $\alpha$  (Fu et al., 2003). Los resultados de este estudio confirman que la OEA realiza actividades de regulación de la ingesta y del peso corporal actuando como agonista de los PPAR $\alpha$ . También se comprueba la habilidad de la OEA para reprimir la expresión

de iNOS en el yeyuno de los ratones, a través de la activación de los receptores PPAR $\alpha$ , sugiriendo que una regulación a la baja de NO puede contribuir a la inducción de la saciedad por parte de este mediador lipídico. Además la OEA, a través de la activación de los PPAR $\alpha$ , produce la estimulación y movilización de los ácidos grasos (Guzmán et al., 2004). La OEA incrementa los niveles de glicerol y de ácidos grasos desde los adipocitos y la oxidación de los ácidos grasos en varios tipos celulares *in vitro*. La actividad inductora de la lipólisis de la OEA se observa también *in vivo*, donde el tratamiento con OEA reduce la ganancia de peso y el contenido de triacilglicérol en ratas obesas y ratones control, pero no en los ratones deficientes de PPAR $\alpha$ .

### 2.6.1. OLEOILETANOLAMIDA, INFLAMACIÓN Y NEUROPROTECCIÓN

Como se explica en el primer capítulo de esta tesis, la activación de los PPAR $\alpha$  modula la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria. La activación de estos receptores produce efectos anti-inflamatorios a través, principalmente, de la regulación de las vías de AP-1 y de NF- $\kappa$ B.

A través de un mecanismo dependiente de la activación de los PPAR $\alpha$  la OEA presenta propiedades analgésicas reduciendo las respuestas nociceptivas (Suardíaz et al., 2007). En este mecanismo también estaría implicada la transmisión glutamatérgica, ya que la coadministración de MK801 (antagonista NMDA) junto con la OEA potencia los efectos analgésicos de ésta.

Como se ha señalado al principio de este capítulo, los endocannabinoides y más específicamente las NAEs pueden realizar funciones neuroprotectoras. En concreto los efectos neuroprotectores de la OEA siguen un patrón de curva U dosis-respuesta, en el cual sólo algunas dosis son efectivas y elevadas dosis de OEA presentan efectos adversos (Galán-Rodríguez et al., 2009). En dicho estudio la OEA presenta un papel protector parcial y dependiente de dosis tanto en cultivos de neuronas, como en modelos *in vivo* donde protege contra la muerte neurotóxica inducida por la neurotoxina 6-OHDA. Estas propiedades neuroprotectoras de la OEA ocurren a través de los PPAR $\alpha$ . En un modelo de isquemia en ratón se comprueba que el pretratamiento con OEA reduce el volumen de infarto tras la oclusión de la arteria cerebral en los ratones control pero no en los carentes de PPAR $\alpha$  (Sun et al., 2007). La OEA incrementa en la corteza frontal la expresión de i $\kappa$ B $\alpha$ , restringiendo la actividad del NF- $\kappa$ B y reduciendo el daño cerebral. Ésta aciletanolamida, al regular la vía de señalización del NF- $\kappa$ B, produce

disminución de la expresión de COX-2. Esta COX-2 es la enzima responsable de la producción de PGs que potencian el dolor y la inflamación, por lo que la OEA mediante esta vía podría llegar a ejercer una función neuroprotectora.

## 2.7. ENDOCANNABINOIDES, ACILETANOLAMIDAS Y ENFERMEDADES DEL SNC

El sistema endocannabinoide se encuentra presente en la regulación del eje HPA. Como ya hemos visto, la neuroinflamación produce activación de este eje controlando las respuestas del organismo frente a un daño o infección para recuperar la homeostasis, por lo que numerosos estudios sobre tratamientos para enfermedades que cursan con neuroinflamación se han dirigido al estudio del sistema endocannabinoide. Además, este sistema está formado por una serie de elementos que se encuentran amplia y densamente expresados en el sistema inmune de los mamíferos y en el cerebro, por lo que representan una importante diana terapéutica para un gran número de trastornos inflamatorios periféricos y centrales (Centonze et al., 2007). Se ha comprobado que los agonistas de los receptores endocannabinoides modulan la función inmune y la respuesta inflamatoria en varios tipos de patologías como epilepsia, ansiedad, depresión y enfermedades neurodegenerativas (Pertwee, 2012).

En cuanto a las funciones del sistema endocannabinoide, además del papel neuromodulador que éste realiza también se ha visto su participación en la supervivencia neuronal. Los endocannabinoides ejercen neuroprotección contra isquemia, daño traumático o daño neuronal inflamatorio a través de diversos mecanismos entre los que se encuentran el bloqueo de la activación microglial, la disminución de los niveles de enzimas y mediadores pro-inflamatorios, el incremento de los niveles de factores neurotróficos, la reducción del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  o el aumento de la actividad antioxidante (Zogopoulos et al., 2013). Los endocannabinoides, mediante la activación del  $\text{CB}_1$ , protegen del daño cerebral agudo, la neuroinflamación y la neurodegeneración. A través de la activación del  $\text{CB}_2$  en células gliales limitan la neuroinflamación y contribuyen a la neuroprotección. Además, también pueden ejercer esta neuroprotección mediante mecanismos independientes de los receptores CB, por ejemplo mediante la generación de otras moléculas bioactivas por parte de enzimas que metabolizan los endocannabinoides (como COX-2), o mediante las NAEs que ejercen propiedades neuroprotectoras a través de los PPAR (Galve-Roperh et al., 2008).

Aunque algunos estudios han demostrado que elevados niveles de endocannabinoides pueden ejercer acciones neurotóxicas. En este caso sería determinante el balance entre neuroprotección y neurotoxicidad que se produce por la diferente capacidad de unión de los endocannabinoides a los distintos receptores, ejerciendo principalmente neuroprotección a través de los CB<sub>1</sub> o neurotoxicidad a través de los TRPV1.

Numerosos estudios demuestran la implicación del sistema endocannabinoide en los procesos cognitivos y fisiológicos de la adicción al alcohol, la nicotina, los opioides o los psicoestimulantes (Serrano y Parsons, 2011). La actividad del sistema endocannabinoide se ha puesto de manifiesto tanto en la motivación hacia el consumo de drogas, como en las alteraciones del sistema inducidas por la droga que contribuyen a varios aspectos de la adicción como la desregulación de la plasticidad sináptica, el incremento de la capacidad de respuesta a estrés, los estados emocionales negativos y los mecanismos implicados en el sistema de recompensa y en la recaída. El potencial de la modulación del sistema endocannabinoide en el tratamiento de la adicción a drogas de abuso ha sido estudiado, tanto en modelos animales como humanos, investigándose sus efectos en los comportamientos de adquisición, mantenimiento y recaída al consumo de estas drogas (Oliere et al., 2013).

En el caso concreto de las NAEs, varios estudios han demostrado que los niveles endógenos de estas moléculas se encuentran alterados en diversas patologías del SNC. Por ejemplo, niveles incrementados de PEA se encuentran directamente relacionados con la aparición de algunos síntomas de enfermedades como la esclerosis múltiple o el Huntington (Baker et al., 2001; Bisogno et al., 2008). En modelos de isquemia cerebral aumentan los niveles endógenos de NAEs debido al incremento de la producción y la disminución de la degradación (Berger et al., 2004). Estos niveles elevados de NAEs realizan una función neuroprotectora frente a la isquemia cerebral (Degn et al., 2007). Situaciones de estrés o depresión también han demostrado alterar los niveles plasmáticos de NAEs (Hauer et al., 2013; Hill et al., 2009). Esta relación entre los niveles de NAEs y las enfermedades del SNC ha servido para diseñar estudios experimentales en los que se comprueba la posible función de la administración exógena de NAEs ante patologías del SNC. En este sentido la administración sistémica de OEA ha demostrado ejercer una función neuroprotectora en un modelo experimental de Parkinson (Gonzalez-Aparicio et al., 2014), o su administración oral proteger contra el daño cerebral isquémico (Zhou et al., 2012). La administración de PEA también es

capaz de disminuir el daño en un modelo de isquemia (Ahmad et al., 2012b) y ejerce protección neurovascular y reduce la zona afectada tras un daño cerebral traumático (Ahmad et al., 2012a).

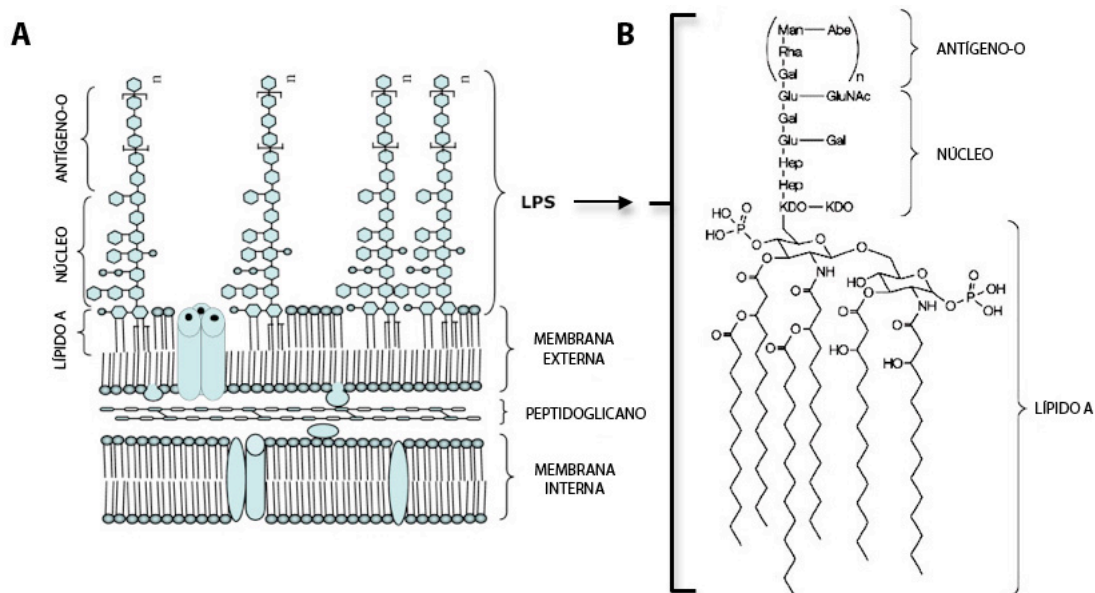
Las NAEs también han demostrado participar en aspectos de la adicción, por ejemplo, están implicadas en el control de los sistemas de búsqueda y recompensa en la adicción a drogas (Orio et al., 2013). La OEA, en concreto, ha demostrado actuar como modulador de la respuesta dopaminérgica asociada al consumo de nicotina (Melis et al., 2008), presentar una actividad reguladora de la alteración locomotora inducida por cocaína (Bilbao et al., 2013) y un papel modulador del consumo y de la respuesta motivacional al alcohol (Bilbao et al., 2015).

### **3. EL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)**

#### **3.1. ESTRUCTURA DEL LPS**

Las bacterias Gram negativas presentan una membrana doble que cuenta con una capa interna plasmática y una externa con lipoproteínas y lipopolisacáridos, entre ambas se localiza una fina capa de peptidoglicano. El LPS es el componente mayoritario de la pared de las bacterias gram negativas y uno de los estimuladores más potentes del sistema inmune innato. La estructura del LPS varía de unas bacterias a otras confiriéndoles diferente virulencia. Se han descubierto enzimas y productos génicos capaces de modificar la estructura base del LPS de las bacterias. Estas modificaciones están estrechamente reguladas en la célula y relacionadas con la virulencia bacteriana (Wang y Quinn, 2010). Las variaciones estructurales pueden producir la resistencia a los CAMPs del organismo y alterar el reconocimiento por los receptores del sistema inmune (Dixon y Darveau, 2005).

El LPS de *Escherichia coli* consta de tres regiones unidas covalentemente (**Figura 7**): el lípido A (endotoxina), un núcleo central de oligosacáridos y un polisacárido distal llamado antígeno O.



**Figura 7:** **A.** Dibujo de la sección de la membrana de las bacterias gram negativas (adaptado de Cardoso et al., 2006). **B.** Estructura química del LPS (adaptado de Miller et al., 2005). Se representan el lípido A, el núcleo de oligosacáridos y el antígeno O, los tres componentes del LPS.

El lípido A es el componente hidrofóbico del LPS y posee una estructura conservada reconocible por los receptores del sistema inmune innato. El lípido A se considera el responsable de la toxicidad de las bacterias gram negativas (Galanos et al., 1985). Está formado por un disacárido de glucosamina unido por enlace éster con ácidos grasos. El oligosacárido nuclear se encarga de la unión del lípido A al polisacárido O y se divide en un subdominio externo y otro interno. El núcleo externo está formado por hexosas, en el interno se localizan unos azúcares característicos del LPS, el ácido 3-desoxi-D-manooctosulfónico (kdo) y el L-glicero-D-manoheptosa (Hep). Al menos un residuo de kdo está presente en todos los tipos de LPS, indicando un papel esencial de este azúcar en la supervivencia y crecimiento de las bacterias, principalmente a nivel del ensamblaje de la membrana externa (Raetz, 1990). El antígeno O consiste en una secuencia repetida de unidades disacárido o pentasacárido lineales o polímeros de oligosacáridos ramificados. La longitud de las cadenas O varía entre 0 y 40 unidades repetitivas. Este polisacárido O confiere a la bacteria su especificidad serológica.

### 3.2. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNE POR LPS

La toxicidad del lípido A reside en primera instancia en su capacidad para activar células del sistema inmune, provocando la liberación de citoquinas. Cuando su



concentración es alta se producen efectos en cadena, incluyendo la activación del complemento y de la cascada de coagulación de la sangre, junto con producción de PG y LT.

El LPS es el ligando principal de los TLR4 del sistema inmune innato. Para que se produzca el reconocimiento del lípido A es necesario que el receptor forme un complejo con una serie de proteínas accesorias. La proteína de unión al LPS (LBP) presente en el suero (Schumann et al., 1990), es una proteína de fase aguda que convierte las micelas oligoméricas del LPS en un monómero. La LBP actúa como molécula transportadora del LPS y acelera su unión a la proteína accesoria llamada cluster de diferenciación 14 (CD14) (Hailman et al., 1994). La CD14 puede encontrarse soluble o anclada a la membrana y su función consiste en concentrar el LPS para unirlo al receptor. Se ha comprobado que la CD14 es importante para el incremento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias producido por el LPS (Wright et al., 1990). La CD14 fue el primer PRR identificado que une directamente LPS y que es capaz de transferirlo al complejo TLR4-MD2 (proteína de diferenciación mieloide 2) (da Silva Correia et al., 2001).

Tal como apuntaban Wright y colaboradores en 1990 (Wright et al., 1990), para la activación de los receptores del LPS también es necesaria la presencia de otra proteína accesoria. Esta proteína es la MD2 (Shimazu et al., 1999) que forma un complejo con el dominio extracelular del TLR4 para el reconocimiento del LPS. Para comprender el proceso de unión del LPS al complejo TLR4/MD2, fue importante averiguar que la MD2 pertenecía a un grupo de compuestos con capacidad de interacción con lípidos de membrana (Inohara y Nunez, 2002). Varios estudios indican que el LPS presenta una unión mediada por la cadena del lípido A al sitio hidrofóbico de esta MD2 (Gangloff y Gay, 2004; Gruber et al., 2004).

Gracias a un estudio con ratones deficientes en TLR4 se confirma que el LPS ejerce su actividad por este tipo de receptores (Hoshino et al., 1999). Tras la unión del LPS al dominio extracelular del TLR4 se inicia una cascada intracelular de transducción de la señal por dos posibles vías, una dependiente de MyD88 y otra dependiente de TRIF (como se ha explicado en el punto 1.3.3 de esta Tesis Doctoral), que conducirán a la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y a la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria. Se ha visto que CD14 participa en cierta medida en la activación de la vía dependiente de MyD88, pero que tendría un papel fundamental para la expresión de IFN mediada por TRIF (Jiang et al., 2005). El

incremento de los mediadores pro-inflamatorios y de los factores neurotóxicos producido por el LPS es dependiente de MyD88. El cultivo de microglía de ratones deficientes de MyD88 expuestos al LPS y el posterior cultivo de neuronas en ese medio, muestra un aumento rápido y sostenido de mediadores inflamatorios y un incremento de la apoptosis neuronal en los cultivos de los ratones control pero no en los deficientes de MyD88 (Dean et al., 2010).

### 3.3. EL LPS Y LAS RESPUESTAS DE FASE AGUDA

La administración sistémica de LPS produce un comportamiento específico denominado “sickness behavior” (Dantzer, 2004) que se caracteriza por letargia, disminución de la actividad locomotora y el apetito, anhedonia (incapacidad de sentir placer con actividades de recompensa naturales), alteración del sueño, e incremento de la sensibilidad al dolor. Estos síntomas son muy parecidos a los que se producen durante la depresión (Dantzer, 2004; Dantzer et al., 2008). Además de la similitud en los síntomas, tanto en la depresión como tras la administración de LPS se encuentran niveles elevados de marcadores inflamatorios, por lo que a pesar de las evidentes limitaciones del modelo, la administración de LPS se ha utilizado para replicar el comportamiento depresivo relacionado con inflamación.

La administración de LPS se ha utilizado para comprobar los efectos comportamentales de la activación del sistema inmune (Yirmiya, 1996). Uno de los síntomas del “sickness behavior”, la anhedonia (incapacidad de sentir placer) puede estudiarse mediante dos indicadores: la reducción de la ingesta de sustancias con alta palatabilidad (mediante la preferencia a sacarina o sacarosa) y la supresión del comportamiento sexual, tras la inyección sistémica de LPS. Además, se ha observado que la disminución de la preferencia a sacarina por el LPS ocurre de una forma dependiente del tiempo, disminuyendo también el consumo total de la misma (Biesmans et al., 2013).

En modelos animales se ha comprobado que la administración sistémica tanto de LPS como de citoquinas induce varios de los síntomas de la depresión, incluida la anhedonia (De La Garza, 2005). Además, en estudios con voluntarios sanos se ha demostrado que la administración de dosis bajas de endotoxina produce síntomas de depresión, ansiedad y empeoramiento cognitivo, en las horas consecutivas a la misma,

que se correlacionan con un incremento de las concentraciones de citoquinas (Reichenberg et al., 2001).

La administración de LPS además de desencadenar las respuestas de fase aguda comportamentales mencionadas, síndrome constitucional o “sickness behavior”, también se caracteriza por producir alteraciones fisiológicas a nivel del eje HPA (Catena-Dell'Osso et al., 2011). El LPS eleva los niveles de citoquinas capaces de desencadenar la hiperactividad del eje HPA. Estas citoquinas estimulan la producción de CRH en el hipotálamo que a su vez aumenta la producción de ACTH en la glándula pituitaria, incrementando la liberación de cortisol por la corteza de las glándulas suprarrenales (Beishuizen y Thijs, 2003). Esta hiperactividad puede venir mediada por la alteración del mecanismo de autorregulación de la secreción de GC, al no funcionar correctamente la retroalimentación negativa por desensibilización de los receptores de GC (Garcia-Bueno et al., 2008). Los cambios neuroendocrinos tras la inyección de LPS, así como la disfunción del eje y el hipercortisolismo son similares a los expresados en pacientes con depresión. Un estudio demuestra que los niveles basales de GC son un parámetro relevante para predecir las diferencias individuales en la actividad del eje HPA como repuesta al LPS (Perez-Nievas et al., 2010).

La activación del eje HPA producida por el LPS y la inflamación sistémica que se desencadena producen otra respuesta de fase aguda fisiológica, la regulación de la temperatura corporal. En los humanos las infecciones se caracterizan por producir fiebre, pero en el caso de los roedores la respuesta termorreguladora frente a la infección puede variar. La inyección de LPS estimula la secreción de citoquinas pudiendo producir fiebre, hipotermia precedida de fiebre, o incluso llegar a provocar hipotermia y mortalidad por colapso circulatorio. Por ejemplo el TNF- $\alpha$  produce hipotermia en las primeras horas tras la inyección del LPS, aunque en algunos casos puede ejercer acción pirógena endógena. La IL-1 $\beta$  y la IL-6 se consideran pirógenos endógenos, pero durante infecciones virales o bacterianas pueden producir hipotermia (Leon, 2004). La inducción de hipotermia o hipertermia causada por el LPS es específica del serotipo utilizado. Se ha sugerido que la hipotermia y la fiebre posterior generadas por el LPS podrían ocurrir como dos estrategias independientes de regulación del sistema inmune (Dogan et al., 2002), este estudio demuestra que un inhibidor inespecífico de COX es capaz de frenar la hipotermia mientras que un inhibidor inespecífico de NOS suprime la fiebre prolongando la hipotermia.

### 3.4. EL LPS COMO MODELO DE NEUROINFLAMACIÓN

La administración de LPS ha servido como modelo para estudiar el comportamiento y la respuesta fisiológica producidos por la activación del sistema inmune. El LPS produce esta activación en una forma dependiente de dosis, incrementando las respuestas de fase aguda e inflamación con producción de mediadores pro-inflamatorios (Miller et al., 2005). El LPS ha sido usado extensamente para producir tanto inflamación periférica como neuroinflamación, comprobándose su capacidad para llevar a cabo funciones como la rápida activación de la microglía, el incremento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, la infiltración de células inmunes en el parénquima cerebral y la capacidad de provocar neurodegeneración (Zhou et al., 2009; Cunningham et al., 2005; Qin et al., 2007).

Numerosos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, se han dirigido a valorar el incremento de los mediadores pro-inflamatorios producidos por el LPS. En estudios *in vitro* se ha comprobado que el LPS producía activación de la microglía e incremento temporal de citoquinas pro-inflamatorias y NO (Nakamura et al., 1999). Se ha visto que la administración aguda y sistémica de LPS incrementa las citoquinas a nivel periférico y central, siguiendo cada una de ellas un patrón de aumento espaciotemporal determinado (Erickson y Banks, 2011; Andre et al., 2008). Las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  presentan niveles máximos de concentración en plasma entre las 2 y las 6 horas siguientes a la inyección de LPS. Durante este intervalo de tiempo es cuando se observan claramente los síntomas comportamentales relacionados con el “sickness behaviour” (Dantzer et al., 2008). Además, un estudio reciente ha caracterizado con detalle todos los factores implicados en el establecimiento de la neuroinflamación tras la inyección sistémica de LPS (Cazareth et al., 2014), comprobando el incremento de citoquinas y quimioquinas en el cerebro, la activación de la microglía y los fagocitos asociados al SNC y la infiltración de células inmunes. El modelo de administración de LPS purificado se ha utilizado también en humanos, en los que se consigue una respuesta inflamatoria sistémica que mimetiza la respuesta originada durante infecciones o patologías que cursan con inflamación. Este modelo en humanos ha permitido la caracterización del patrón temporal del incremento de citoquinas, quimioquinas y otros mediadores inflamatorios en el plasma de sujetos sanos tras la administración de dosis bajas de LPS (Andreassen et al., 2008). La capacidad del LPS para producir neuroinflamación se ha utilizado por algunos autores como modelo

experimental de depresión, debido al componente neuroinflamatorio que presenta dicha enfermedad.

La depresión está relacionada con la activación de la respuesta inflamatoria caracterizada por el incremento de mediadores inflamatorios. Varios estudios han detallado en pacientes depresivos, el incremento de los niveles en plasma o líquido cefalorraquídeo de citoquinas inflamatorias circulantes (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ), receptores solubles de citoquinas (IL-6R, IL-1R y IL-2R), interferones (IFN $\gamma$ ) y proteínas de fase aguda (proteína C-reactiva) (Dowlati et al., 2010; Maes et al., 1997; Liu et al., 2012; Schiepers et al., 2005; Howren et al., 2009). Los niveles de estas citoquinas en líquido cefalorraquídeo se encuentran correlacionados con la severidad de los síntomas de pacientes con depresión (Martinez et al., 2012) confirmándose una inflamación central en pacientes con depresión.

Estudios experimentales y clínicos han demostrado que los compuestos anti-inflamatorios podrían ejercer efectos antidepresivos (Hayley, 2011). Además, los antidepresivos tanto en pacientes como en modelos animales han demostrado propiedades anti-inflamatorias reduciendo los niveles de citoquinas pro-inflamatorias e incrementando los de anti-inflamatorias (Song et al., 2009; Yoshimura et al., 2009). Un meta-análisis que estudia los niveles de citoquinas en plasma de pacientes con depresión tratados con diferentes antidepresivos, sugiere que modifican los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-6 pero no así los de TNF- $\alpha$ , aunque los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina sí muestran un posible efecto sobre los niveles tanto de IL-6 como de TNF- $\alpha$  (Hannestad et al., 2011). Se ha observado también que los antidepresivos son capaces de estimular la expresión de factores neurotróficos, beneficiando la neurogénesis en pacientes depresivos o en modelos animales de depresión (Schmidt y Duman, 2007). Sin embargo, los complejos procesos inflamatorios que concurren en la depresión y la ausencia de conocimiento suficiente sobre la conexión e implicación en su fisiopatología han cuestionado el uso de este tipo de compuestos antiinflamatorios como fármacos eficaces por sí mismos en su tratamiento, considerando más bien su uso como coadyuvantes como posibilidad para evitar las resistencias a los tratamientos convencionales. Se hace necesario, por ello, una mayor investigación en todos estos fenómenos para el desarrollo de nuevos y más eficaces compuestos con acción farmacológica en patologías neuropsiquiátricas.

Un modelo animal de depresión con administración crónica de LPS ha demostrado la asociación de esta patología con el incremento del estrés oxidativo y la producción de GC (Kubera et al., 2013). En modelos animales de depresión se ha observado un incremento de los niveles de ROS/RNS y de substratos reactivos del ácido tiobarbitúrico, como el MDA, compuesto previamente mencionado como indicador de peroxidación lipídica (Maes et al., 2011). La administración de LPS muestra que la activación de la microglía y los astrocitos provocan incrementos en los niveles de iNOS. Este incremento de iNOS produce niveles elevados de NO que inhiben la respiración celular, provocando despolarización e incremento de glutamato seguido de excitotoxicidad, induciéndose así la muerte neuronal (Brown, 2007b). El incremento del estrés oxidativo ha sido descrito también en pacientes con depresión (Sarandol et al., 2007; Forlenza y Miller, 2006).

Varios estudios apuntan que durante la depresión podría producirse neurodegeneración y reducción de la neurogénesis en el hipocampo. Inicialmente las investigaciones en este campo examinaban los efectos de la hipersecreción de los GC producidos por la hiperactividad de eje HPA, que generaban efectos adversos en hipocampo contribuyendo a la neurodegeneración (Sapolsky, 2004). Estudios realizados por Maes en 1995 (Maes, 1995) indicaban que el incremento de GC se debía, al menos en parte, al aumento de los niveles de citoquinas. Actualmente se sabe que en pacientes con depresión ocurre una selectiva y persistente pérdida de volumen hipocampal, producida no sólo por la inducción de muerte neuronal sino también por la disminución de la neurogénesis. Se ha comprobado que la administración de LPS y la neuroinflamación causada, producen supresión de la neurogénesis hipocampal (Ekdahl et al., 2003). También se ha demostrado el papel directo que ejercen elevados niveles de citoquinas sobre la inhibición de la neurogénesis (Goshen et al., 2008; Vallieres et al., 2002) y que el bloqueo de la respuesta inflamatoria reduce esta inhibición (Monje et al., 2003; Koo y Duman, 2008). Es en el año 2009 cuando Maes formula la hipótesis inflamatoria y neurodegenerativa de la depresión, en la que relaciona la activación de las células inmunes y la vía inflamatoria con la consecuente producción de ROS/RNS, como una de las posibles causas de neurodegeneración y reducción de la neurogénesis.

### 3.5. LA NEUROINFLAMACIÓN POR TRASLOCACIÓN BACTERIANA

En los últimos años, se ha estudiado la posibilidad de que el estado inflamatorio periférico, detectado en depresión y en otras patologías neuropsiquiátricas, provoque una disfunción intestinal que permite el paso al torrente circulatorio de bacterias y/o sus componentes que podrían jugar un papel en la fisiología de estas enfermedades actuando a través de los receptores del sistema inmune innatos y, eventualmente, contribuir a la neuroinflamación detectada. Varios estudios han descrito la translocación bacteriana en modelos animales de estrés (Ponferrada et al., 2007; Caso et al., 2009; McDowell et al., 2014) y cómo la ausencia de bacterias en el intestino, a través de un protocolo de descontaminación intestinal, consigue restablecer parámetros inflamatorios y de daño en el cerebro (Garate et al., 2011). También se han descrito marcadores relacionados con el “leaky gut” (el paso de sustancias a través del epitelio intestinal), como la presencia de IgM e IgA de varias especies bacterianas de origen intestinal en sangre de pacientes con depresión (Maes et al., 2012). Sin embargo, la mera presencia de bacterias en otros órganos no implica que el SNC esté siendo afectado. En este sentido, distintos mecanismos actuando en paralelo han sido propuestos para explicar la monitorización que realiza el cerebro sobre la respuesta inmune que se produce en la periferia. Dichos mecanismos incluyen citoquinas producidas localmente que estimulan nervios aferentes primarios, los receptores de inmunidad innata que se expresan en las células endoteliales y en las células tipo macrófago en el plexo coroideo y los órganos ventriculares, transportadores de citoquinas pro-inflamatorias en la barrera hematoencefálica y los receptores de citoquinas localizados en los macrófagos perivascuales y las células endoteliales de los vasos del cerebro (Dantzer et al. 2008).

## **4. EL ALCOHOL:**

El consumo abusivo de alcohol se encuentra dentro de los principales factores prevenibles causantes de enfermedades y muertes en todo el mundo. Se ha calculado que el alcohol provoca cada año la muerte de 3,3 millones de personas. Es el factor causal de más de 200 tipos de enfermedades y se asocia con el riesgo de desarrollar problemas de salud como dependencia, cirrosis hepática, enfermedades cardiovasculares, cáncer y daños cerebrales (Organización Mundial de la Salud, 2014).

Además, diferentes estudios demuestran que el alcohol afecta al sistema inmunitario incrementando la incidencia de enfermedades infecciosas. El consumo excesivo de alcohol también se relaciona con consecuencias socioeconómicas negativas, tanto para las personas del entorno del consumidor como para la sociedad en general.

La organización mundial de la salud describe tres mecanismos de daño directo producidos por el alcohol en el consumidor: los efectos tóxicos en órganos y tejidos; la intoxicación que produce empeoramiento de la coordinación, la consciencia, la cognición, la percepción y los sentimientos afectivos; y la dependencia y pérdida de control sobre el consumo de esta sustancia.

#### 4.1. EL CONSUMO INTENSIVO DE ALCOHOL EN ATRACÓN O “*BINGE DRINKING*”

De entre los diferentes patrones de consumo de alcohol, el consumo intensivo en atracón, denominado *binge drinking* se considera uno de los más dañinos para el individuo. Es el patrón de consumo de alcohol prevalente entre los adolescentes y los jóvenes en Europa y Estados Unidos (Farke y Anderson, 2007; Patrick y Schulenberg, 2013), aunque también es una forma de consumo habitual entre la población adulta (Nelson et al., 2009).

Las definiciones del término *binge drinking* pueden presentar ciertas variantes pero todas incluyen dos características principales: la ingesta de cierto número de bebidas alcohólicas en un determinado espacio de tiempo que produce intoxicación y una forma de consumo intensivo de alcohol que se relaciona con características clínicas de abuso y dependencia.

El Instituto Nacional de Abuso de Alcohol y Alcoholismo (NIAAA) de Estados Unidos define el *binge drinking* como una forma de consumo que eleva los niveles de alcohol en sangre por encima de 80 mg/dL (0,08%). Se ha establecido que un episodio de *binge drinking* suele ocurrir cuando una mujer consume 4 o más unidades de bebida alcohólica estándar, o un hombre 5 o más, en aproximadamente dos horas. Tanto el número de bebidas como el tiempo en el que se consumen pueden variar un poco entre unos países y otros. Las unidades de bebida estándar se calculan para cada tipo de bebida alcohólica teniendo en cuenta los gramos de alcohol que tiene cada una. El cálculo realizado varía en los diferentes países por lo que siempre hay que tener en



cuenta las diferencias de alcohol puro en cada caso. Además, para clasificar en los estudios a consumidores tipo *binge drinking* también suelen tenerse en cuenta otros parámetros como la edad, la rapidez del consumo de cada bebida o el intervalo de tiempo transcurrido entre bebidas, entre otros.

Este tipo de consumo intensivo de alcohol ha demostrado producir también consecuencias negativas en la salud de los consumidores y en la sociedad, a corto y a largo plazo (Maldonado-Devincci et al., 2010; Plant et al., 2009). El *binge drinking* se considera un factor de riesgo para desarrollar varios tipos de enfermedades como la diabetes (Lindtner et al., 2013) o las enfermedades coronarias entre otras (Rehm et al., 2003; Sundell et al., 2008). Además, se sabe que este tipo de consumo incrementa el riesgo de desarrollar dependencia al alcohol (Courtney y Polich, 2009) y se ha encontrado una relación positiva entre el inicio del consumo de alcohol en forma de *binge drinking* en etapas tempranas de la vida y el riesgo posterior de desarrollar dependencia al alcohol (Hingson et al., 2006; Esser et al., 2014).

El alcohol produce daños estructurales y funcionales en el cerebro. En cuanto a los daños estructurales, tanto en estudios de neuroimagen como en análisis postmortem del cerebro de alcohólicos se ha observado que el abuso de alcohol causa disminución de la masa cerebral (Kril y Halliday, 1999). Se ha comprobado una pérdida de neuronas en varias áreas del cerebro de alcohólicos como la corteza prefrontal, el hipotálamo y el cerebelo. La disminución de la masa cerebral se ha observado también en consumidores tipo *binge drinking* y se atribuye principalmente a la pérdida de volumen de sustancia blanca, sobre todo en la corteza frontal (DeBellis et al., 2005; Medina et al., 2008). Junto con la pérdida de neuronas y de sustancia blanca se han observado alteraciones y déficits en las células gliales de la corteza prefrontal y el hipocampo en cerebros de alcohólicos (Miguel-Hidalgo et al., 2002; Korbo, 1999). En cuanto a los daños funcionales se ha visto que el consumo de alcohol *binge drinking* produce empeoramiento a nivel cognitivo en tareas de memoria y planificación y funciones ejecutivas (Hartley et al., 2004). También afecta a la memoria de trabajo espacial y a tareas de reconocimiento (Tapert et al., 2004; Weissenborn y Duka, 2003). Además, el consumo intensivo de alcohol produce déficits del control inhibitorio frontal (Townshend y Duka, 2005).

#### 4.2. MODELO “BINGE DRINKING” EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Como consecuencia del grave problema de salud pública que representa este tipo de ingesta de alcohol, varios modelos animales han sido desarrollados para replicar y comprender los mecanismos implicados en las alteraciones fisiopatológicas y comportamentales producidas por el patrón de consumo de alcohol *binge drinking*. Estos modelos animales también se utilizan para definir posibles dianas terapéuticas de tratamientos contra el abuso de alcohol y la adicción.

La administración intragástrica repetida de altas dosis de alcohol (Majchrowicz, 1975) es un modelo validado y ampliamente utilizado de *binge drinking* en animales de experimentación. Este modelo puede tener algunas variantes pero normalmente consiste en la administración intragástrica de altas dosis de alcohol 3 veces al día durante 4 días consecutivos. Teniendo en cuenta que ningún modelo animal puede reproducir a la perfección un trastorno humano, el modelo *binge drinking* abarca varios criterios extrapolables a humanos. Mediante este modelo se consigue un aumento continuado de niveles de alcohol en sangre induciendo cambios comportamentales indicadores de intoxicación etílica y de dependencia física al alcohol. Además de producir síntomas comportamentales, este modelo también ha demostrado producir intoxicación a nivel farmacológico, provocando neuroinflamación y alteración de los sistemas neurotransmisores (Coleman et al., 2011; Ward et al., 2009). Por tanto, entre las ventajas principales de este método destacan la posibilidad de controlar exactamente la cantidad de alcohol que se administra al animal en cada dosis y la obtención de niveles de alcohol en sangre farmacológicamente relevantes y constantes en los animales de estudio.

Gracias a este modelo *binge drinking* en animales se ha podido comprobar también que el consumo intensivo de alcohol en el cerebro produce neurodegeneración en el sistema corticolímbico (Collins et al., 1996; Zou et al., 1996; Obernier et al., 2002a) y déficits cognitivos a corto y largo plazo (Obernier et al., 2002b). Además, la relación que existe entre el daño oxidativo y la neuroinflamación en el alcoholismo ha podido ser estudiada mediante este modelo de consumo (Crews et al., 2006a).

### 4.3. ALCOHOL Y NEUROINFLAMACIÓN

Se han postulado varias hipótesis para explicar la neurodegeneración que produce el consumo intensivo de alcohol. Algunas de las hipótesis más relevantes son: la capacidad del alcohol de inducir cambios en la presión cerebral provocando daño cerebral inducido por edema (Tajuddin et al., 2014); el daño producido por el incremento del estrés oxidativo y la producción de ROS/RNS (Haorah et al., 2008); o el daño celular que produce la activación de la respuesta inflamatoria por el alcohol (Zahr y Sullivan, 2008). Además, también se ha demostrado que el incremento de la permeabilidad bacteriana y la disfunción en el hígado son capaces de producir daño cerebral en alcoholismo (Wang et al., 2010).

#### 4.3.1. INCREMENTO DE MEDIADORES PRO-INFLAMATORIOS Y ACTIVACIÓN DE CÉLULAS GLIALES

La respuesta inflamatoria juega un papel importante en la neurodegeneración producida por el alcohol. En lo que se refiere a los factores pro-inflamatorios, el abuso de alcohol se correlaciona con un incremento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias sistémicas (McClain et al., 1999). El alcohol altera también los niveles de citoquinas en otros tejidos como el hígado, los pulmones y el cerebro (Crews et al., 2006b). Además, el alcohol eleva los niveles de la quimioquina MCP-1 en cerebro (He y Crews, 2008), que mediante la activación de la microglía es capaz a su vez de incrementar los niveles de citoquinas proinflamatorias. Varias citoquinas y quimioquinas circulantes (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 y MCP-1) son consideradas biomarcadores de abuso de alcohol y alcoholismo (Achur et al., 2010).

Las citoquinas y las quimioquinas han demostrado ejercer acción sobre los efectos comportamentales del alcohol en animales y humanos. Se ha observado, por ejemplo, que las citoquinas son capaces de modular la función cognitiva demostrándose una relación entre la activación del sistema inmune periférico y la respuesta inmune del cerebro (Yirmiya y Goshen, 2011). También se ha demostrado la regulación que ejercen las quimioquinas sobre el consumo y la preferencia al alcohol (Blednov et al., 2005).

El alcohol ha demostrado participar en la modulación de la activación de las células gliales, afectando a su función, y ser un factor potencial de daño neuronal. El alcohol es capaz de activar tanto la microglía como los astrocitos y aumentar la expresión de factores pro-inflamatorios que pueden modificar la función neuronal. El incremento de

la activación de la microglía también se ha observado en cerebros postmortem de alcohólicos (He y Crews, 2008). Además, el alcohol puede actuar sobre receptores neuronales GABA y NMDA (Vengeliene et al., 2008) alterando a su vez la expresión de otros neurotransmisores y mediante la activación de las células gliales incrementar la expresión de factores pro-inflamatorios. De esta forma se produce un *feedback* positivo de comunicación entre neuronas y células gliales capaz de extender la activación neuroinmune en el SNC. La activación de la microglía se ha visto que también puede contribuir a las consecuencias comportamentales del alcohol incluidas la sedación, el empeoramiento de la función motora (Wu et al., 2011) y el consumo de alcohol (Agrawal et al., 2011).

#### 4.3.2. ACTIVACIÓN DE LOS TLR E INCREMENTO DE LA HMGB1

Varios estudios han comprobado que el alcohol puede activar los TLR en el cerebro, demostrando un papel clave de estos receptores en la neuroinflamación asociada a la exposición al alcohol. El alcohol es capaz de potenciar la respuesta inflamatoria del ácido poli(I:C) a través de los TLR3 (Qin y Crews, 2012), incrementando la expresión de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias y la activación microglial. Esta potenciación además se acompaña de un aumento en la expresión de los TLR3 y de la HMGB1 en el cerebro. Un estudio reciente ha mostrado que el alcohol es capaz de regular al alza la expresión de los TLR4 y de los TLR2 en la microglía y que además promueve la asociación física de TLR4/TLR2 produciendo el aumento de la producción de citoquinas y contribuyendo a la neuroinflamación y la muerte neuronal asociada al abuso de alcohol (Fernandez-Lizarbe et al., 2013). El consumo crónico de alcohol ha demostrado inducir el aumento de mediadores pro-inflamatorios en el cerebro de rata que se asocian con activación de las vías de señalización a través del TLR4/IL-1R1 (Valles et al., 2004). El alcohol es capaz de activar las vías de señalización de las MAPK y del NF- $\kappa$ B mediante los TLR4, liberando mediadores inflamatorios y radicales libres en cultivo de astrocitos (Blanco et al., 2005) y de microglía (Fernandez-Lizarbe et al., 2009) que contribuirán a la neuroinflamación.

El alcohol en el cerebro incrementa la unión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B al DNA tanto en cultivos *in vitro* (Zou y Crews, 2006) como en un modelo de consumo *binge drinking* en animales (Crews et al., 2006a), elevando por tanto la expresión de citoquinas, quimioquinas y enzimas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1,

iNOS). Además, estudios en los que realizan la inhibición farmacológica o genética de los TLR4 (Wu et al., 2012; Alfonso-Loeches et al., 2010) muestran que el alcohol pierde la capacidad de incrementar la actividad de NF- $\kappa$ B y de elevar los niveles de los mediadores pro-inflamatorios, comprobándose, por tanto, que la activación de los TLR4 en el cerebro por el alcohol es un factor clave en la neuroinflamación asociada a su consumo.

La activación causada por el alcohol de la señal de peligro HMGB1/TLR inicia un *feedback* positivo que incrementa y perpetúa la neuroinflamación y se asocia con enfermedades inflamatorias crónicas. En concreto la activación de HMGB1/TLR4 ha demostrado contribuir tanto a la respuesta neuroinmune como a la neurobiología del alcoholismo. Los niveles de expresión de la HMGB1, así como de los propios TLR4, TLR2 y TLR3 se han visto incrementados en el cerebro tras el consumo crónico de alcohol en estudios postmortem del cerebro de alcohólicos, en cultivos *in vitro* y en experimentos con modelos animales (Crews et al., 2013; Whitman et al., 2013). Estos estudios permiten considerar a la HMGB1 una molécula clave tanto en la neurotoxicidad inducida por el consumo de alcohol como en los daños que se producen durante el periodo de abstinencia. Además, se ha demostrado que el consumo de alcohol *binge drinking* durante la adolescencia incrementa el HMGB1 y la señal de los TLR4 (aumentando la expresión de mediadores inflamatorios) en la corteza prefrontal y que esos efectos persisten en el adulto (Vetreno y Crews, 2012). Esta regulación al alza de TLR4/HMGB1 puede contribuir al riesgo de sufrir alcoholismo y otras enfermedades relacionadas con la neuroinflamación.

#### 4.3.3. INTERACCIONES ENTRE ALCOHOL Y LPS

Como se ha señalado en el punto 3.4 de esta Tesis Doctoral, el LPS aumenta la expresión de las citoquinas y otros mediadores pro-inflamatorios en el cerebro. El alcohol es capaz de influir en los efectos producidos por el LPS potenciando la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria. En concreto el pre-tratamiento con alcohol aumenta los efectos del LPS, observándose un incremento muy significativo de las citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) y de la quimioquina MCP-1 en cerebro, hígado y suero (Qin et al., 2008). Además se ha comprobado que ese incremento de citoquinas en el cerebro permanece elevado durante meses. Sin embargo, un estudio muestra que la administración aguda de alcohol tipo *binge* puede producir la

atenuación de la respuesta de los TLR4 al LPS, disminuyendo los niveles de producción de las citoquinas pro-inflamatorias (Bala et al., 2012).

De modo análogo, el LPS es capaz de influir en los efectos del alcohol, por ejemplo, potenciando las alteraciones comportamentales del alcohol a largo plazo. En este sentido, la administración sistémica de LPS ha demostrado incrementar el empeoramiento motor inducido por el tratamiento con alcohol (Drugan et al., 2007).

El incremento de los niveles sistémicos de citoquinas tras la administración de LPS contribuye a la inflamación en el cerebro. Estas citoquinas además de mediar en los cambios neurodegenerativos también promueven el consumo de alcohol. El alcohol incrementa los niveles de TNF- $\alpha$  y de otras citoquinas en el cerebro, reduce el transporte de glutamato induciendo un estado hiperglutamatérgico que activa el sistema límbico dopaminérgico promoviendo el consumo de alcohol y la neurotoxicidad (Crews et al., 2006b). Una única administración de LPS y el consiguiente incremento de citoquinas ha demostrado aumentar el consumo de alcohol hasta 80 días después (Blednov et al., 2011) confirmando una señalización inmune en cerebro mas persistente que la activación inmune periférica.

Se debe destacar que varios estudios han apuntado a una correlación entre los niveles de toxinas bacterianas y moléculas inflamatorias en el cerebro tras el consumo abusivo de alcohol (Leclercq et al., 2012). El alcohol puede producir modificaciones en las uniones de las células epiteliales produciendo el incremento de las toxinas bacterianas en el torrente sanguíneo. Una vez ahí, el LPS puede unirse a los TLR4 de las células Kupffer del hígado y las células mononucleares periféricas e iniciar la cascada de activación de las vías de NF- $\kappa$ B y AP1, que incrementan la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias y de intermediarios tóxicos como el NO. Las citoquinas pueden atravesar la barrera hematoencefálica y promover la señal inmune en el cerebro. Esta nueva vía de actuación del alcohol y las alteraciones en la microbiota intestinal se han relacionado con el incremento del deseo y el consumo de alcohol (Leclercq et al., 2014).

#### 4.4. ALCOHOL, NEUROINFLAMACIÓN Y ADICCIÓN

El alcohol es una droga de abuso capaz de producir tolerancia, dependencia y adicción. La capacidad del alcohol para producir estos síntomas se ha estudiado a

través de las alteraciones que esta sustancia produce en ciertos sistemas de neurotransmisión (gabaérgico, glutamatérgico y dopaminérgico) en áreas corticolímbicas (Alfonso-Loeches y Guerri, 2011). El sistema dopaminérgico mesolímbico parece mediar en la adicción al alcohol y durante el periodo de abstinencia se observa una reducción de la actividad dopaminérgica que puede influir en la búsqueda y necesidad de consumo de la droga. Además, tanto el consumo crónico como agudo de alcohol afectan significativamente a la transmisión glutamatérgica en la corteza prefrontal, lo que estaría directamente relacionado con la adicción. Comportamientos adictivos asociados al abuso de alcohol muestran una pérdida de control sobre el consumo y un incremento de la posibilidad de recaída asociada a la corteza prefrontal (Abernathy et al. 2010).

Varios estudios han destacado la influencia de la neuroinflamación en el consumo y la adicción al alcohol. El consumo intensivo de alcohol en adolescentes y jóvenes ha demostrado ocasionar neurotoxicidad y graves déficits cognitivos y comportamentales en los consumidores (Guerri y Pascual, 2010). Además, los daños cognitivos producidos por el consumo de alcohol en los adolescentes, entre los que se encuentran déficits en el aprendizaje y el desarrollo intelectual, continúan afectando a los individuos cuando son adultos (Zeigler et al., 2005). Las acciones del alcohol sobre la respuesta neuroinmune han demostrado producirse mediante un *feedback* positivo entre el consumo de alcohol y la activación del sistema inmune que desencadena el desarrollo de la dependencia, el incremento del consumo, la tolerancia y el síndrome de abstinencia.

En concreto, el *binge drinking* ha demostrado que la alteración del comportamiento a largo plazo y el daño cerebral se producen como consecuencia de la activación de la respuesta inflamatoria (Pascual et al., 2007). Como se ha comentado anteriormente, el consumo intensivo de alcohol en fases tempranas de la vida se ha relacionado con la posterior aparición de dependencia de esta sustancia. Se ha comprobado que el incremento de los mediadores inflamatorios y la activación de las células gliales aumentan el consumo y la preferencia por el alcohol, y que la activación de HMGB1/TLR4 está relacionada con el riesgo de desarrollar alcoholismo.

La expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune innata se ha encontrado alterada por el consumo de alcohol tanto en humanos como en animales. Esta inducción de genes de la respuesta inmune innata en el cerebro se encuentra relacionada con la neurobiología de la adicción (Crews et al., 2011) y con la pérdida

progresiva de control comportamental y el incremento de sentimientos negativos relacionados con estructuras del lóbulo temporal. Se ha comprobado que muchos de esos genes modificados por el alcohol están relacionados con la activación de la vía desencadenada por los TLR4 que culmina con la expresión de genes que codifican mediadores pro-inflamatorios (Mayfield et al., 2013). En concreto, el incremento en la expresión de los genes del NF- $\kappa$ B contribuye a las alteraciones en la plasticidad neuronal y la neurodegeneración que ocurren en alcohólicos crónicos (Okvist et al., 2007). Además, estas variaciones en la expresión de NF- $\kappa$ B se correlacionan con el riesgo de sufrir alcoholismo y están involucradas en la aparición temprana de la enfermedad (Edenberg et al., 2008). Animales modificados genéticamente para carecer de ciertos genes de la respuesta inmune han mostrado una inhibición de las respuestas relacionadas con el consumo de alcohol incluyendo la disminución de dicho consumo (Blednov et al., 2012).

La vía de señalización neuroinmune y la neuroinflamación se presenta como una posible diana de terapias contra la adicción al alcohol. Debido a la relación existente entre los PPAR y el consumo de alcohol y otras drogas de abuso, se han propuesto algunas terapias anti-adictivas con agonistas PPAR: los agonistas PPAR $\gamma$  son capaces de reducir la ingesta voluntaria de alcohol en ratas (Stopponi et al., 2013) y los agonistas PPAR $\alpha$  y duales  $\alpha/\gamma$  han demostrado también disminuir selectivamente el consumo voluntario y la preferencia en ratones (Ferguson et al., 2014). Un estudio reciente muestra la actividad de la aciletanolamida OEA, agonista PPAR $\alpha$ , en la regulación de la adicción al alcohol, el síndrome de abstinencia y la recaída (Bilbao et al., 2015), aunque se desconoce si la OEA realiza esta función mediante una acción anti-inflamatoria.

Debido a todos estos indicios, la búsqueda de tratamientos efectivos contra el abuso de alcohol se ha centrado tanto en inhibir la respuesta inflamatoria y la activación microglial producida por el alcohol, como en inhibir la expresión de los genes de la respuesta inmune innata.





***ANTECEDENTES,  
HIPÓTESIS Y  
OBJETIVOS***



## ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La neuroinflamación se encuentra relacionada con la aparición y la progresión de varias enfermedades neurodegenerativas (Glass et al., 2010) y neuropsiquiátricas como la depresión (Song y Wang, 2011) o la adicción a drogas como el alcohol (Cui et al., 2014). Debido a la gran incidencia de estas patologías y a la necesidad de encontrar nuevos fármacos para combatir las, la neuroinflamación ha surgido como posible diana terapéutica para desarrollar tratamientos eficaces frente a este tipo de enfermedades.

El consumo abusivo de alcohol está relacionado con la aparición de muchas enfermedades y de alteraciones estructurales, funcionales y cognitivas en el cerebro, sobre todo a nivel de la corteza frontal. El patrón de consumo intensivo de alcohol o *binge drinking* se considera la forma de consumo más habitual entre los adolescentes y los jóvenes y se da también en consumidores adultos. Este consumo intensivo de alcohol ha demostrado producir consecuencias negativas en la salud de los consumidores y estar relacionado con la aparición de dependencia al alcohol.

La administración intragástrica de elevadas dosis de alcohol a animales de experimentación ha sido un método validado y ampliamente utilizado (Faingold, 2008) para conseguir niveles elevados de alcohol en sangre y reproducir las consecuencias del consumo tipo *binge drinking* en humanos. Este modelo de consumo de alcohol ha demostrado causar neuroinflamación y neurodegeneración en la corteza frontal de los animales de experimentación, por lo que se ha utilizado para estudiar nuevas dianas terapéuticas contra las consecuencias negativas del abuso de esta sustancia.

Existe una relación entre el consumo de alcohol y el LPS, ya que ambos potencian sus efectos a nivel inflamatorio. Varios estudios han demostrado que ante ciertas patologías como el estrés (Ponferrada et al., 2007), la depresión (Maes et al., 2012) o el consumo crónico de alcohol (Keshavarzian et al., 2009) puede producirse el incremento de la permeabilidad intestinal permitiendo el paso de endotoxinas bacterianas al torrente circulatorio. Estas endotoxinas contribuyen a la activación de la respuesta inmune y participan en el desarrollo de la neuroinflamación asociada en estas patologías.

Por una parte, la administración sistémica de LPS ha sido utilizada experimentalmente para producir la activación del sistema inmune. El LPS, al igual que el alcohol, es capaz de actuar a través de los TLR4 (Hoshino et al., 1999)

desencadenando la cascada de transducción de la señal que induce la activación del NF- $\kappa$ B. La activación de este factor de transcripción produce el incremento de la expresión de mediadores pro-inflamatorios y de estrés oxidativo, por lo que la administración de LPS se ha utilizado para el estudio de los parámetros involucrados en la neuroinflamación y la neurodegeneración.

Por otra parte, el LPS es un estresor físico capaz de producir, al igual que el alcohol, respuestas de fase aguda tanto fisiológicas, como la activación del eje HPA y la desregulación de la temperatura corporal, como comportamentales, tales como la anhedonia.

El sistema endocannabinoide ha demostrado tener propiedades anti-inflamatorias y neuroprotectoras (Galve-Roperh et al., 2008). Actualmente, otros lípidos trasmisores derivados de precursores de membrana están siendo foco de interés por sus múltiples acciones fisiológicas y homeostáticas (Orio et al., 2013). Las aciletanolamidas de ácidos grasos son mediadores lipídicos que incluyen al endocannabinoide AEA, que actúa sobre receptores cannabinoides clásicos, y los análogos cannabinoides PEA y OEA, que realizan sus actividades principalmente mediante la activación de los PPAR- $\alpha$ . Mientras que el papel anti-inflamatorio de la PEA ha sido descrito, principalmente a nivel periférico, las funciones de la OEA, molécula descubierta con posterioridad, se asocian a aspectos metabólicos de la ingesta y control de la saciedad. Aunque hay algunos estudios que indican que la OEA puede ejercer funciones de neuroprotección frente a diversas patologías del SNC, el posible papel de este compuesto como modulador de la neuroinflamación y de la neurotoxicidad, así como de las respuestas de fase aguda, todavía es desconocido.

## **HIPÓTESIS:**

Las hipótesis que nos planteamos en este estudio son:

1. La OEA ejerce un papel anti-inflamatorio y neuroprotector frente a la neuroinflamación y el daño neuronal inducidos por el consumo intensivo de alcohol en atracón o *binge drinking*.
2. La OEA puede modular la respuesta inmune/inflamatoria, al igual que otras aciletanolamidas como la PEA, producida por la administración sistémica de LPS.

3. Las aciletanolamidas OEA y PEA pueden regular la activación de las respuestas de fase aguda fisiológicas y comportamentales producidas tras la inyección sistémica de LPS.

### **OBJETIVOS GENERALES:**

1. Estudiar la vía de activación de la respuesta inflamatoria desencadenada por el alcohol en un modelo *binge drinking* o de consumo intensivo de alcohol en rata.
2. Analizar el papel de la OEA en la neuroinflamación y la neurotoxicidad producidas por el alcohol en el modelo animal de consumo tipo *binge drinking*.
3. Analizar el efecto de la OEA y la PEA sobre la neuroinflamación inducida por la inyección sistémica de LPS en rata.
4. Evaluar el papel de la OEA y la PEA en la regulación de las respuestas de fase aguda (activación del eje HPA, termorregulación y anhedonia) producidas por la inyección sistémica de LPS en rata.

### **OBJETIVOS CONCRETOS:**

- 1.1 Determinar el patrón temporal de expresión de los principales mediadores pro-inflamatorios en corteza frontal tras un protocolo de consumo intensivo de alcohol o *binge drinking* en rata.
- 1.2 Determinar la activación del eje HPA mediante la medida de los niveles de corticosterona en plasma inducidos por el consumo intensivo de alcohol o *binge drinking* en rata.
- 2.1 Determinar la acción de la OEA sobre el metabolismo del alcohol, mediante el análisis de los niveles de alcohol en sangre alcanzados en el modelo animal de consumo intensivo de alcohol o *binge drinking*.
- 2.2 Comprobar los efectos del pretratamiento con OEA sobre la vía de señalización HMGB1/TLR4/MyD88 en corteza frontal activada por el consumo intensivo de alcohol o *binge drinking*.
- 2.3 Analizar el efecto del pretratamiento con OEA en la expresión y actividad del NF- $\kappa$ B en corteza frontal inducidas por el alcohol.
- 2.4 Evaluar la acción del pretratamiento con OEA en los niveles de citoquinas plasmáticas y en los niveles de citoquinas, quimioquinas y enzimas pro-

inflamatorias en corteza frontal inducidos el consumo intensivo de alcohol o *binge drinking*.

- 2.5 Analizar el efecto de la OEA sobre la acumulación del producto de la peroxidación lipídica 4-HNE y los marcadores de daño celular como caspasa 3 y HMGB1 en corteza frontal inducidos por el consumo intensivo de alcohol o *binge drinking*.
- 2.6 Determinar los efectos de la OEA sobre los niveles de corticosterona en plasma tras el consumo de alcohol tipo *binge drinking*.
- 3.1 Probar la eficacia de la OEA, comparada con la PEA, para modular el incremento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en plasma y corteza frontal inducido por la administración sistémica de LPS.
- 3.2 Comprobar los efectos de la OEA y la PEA en la activación del NF- $\kappa$ B en corteza frontal tras la inyección aguda de LPS.
- 3.3 Analizar los efectos del pretratamiento con OEA y PEA en los niveles de expresión de las enzimas pro-inflamatorias iNOS y COX-2 en la corteza frontal tras la administración de LPS.
- 3.4 Determinar los efectos de la OEA y la PEA en la acumulación de NO y PGE<sub>2</sub>, principales productos de la actividad de las enzimas pro-inflamatorias, en la corteza frontal tras el LPS.
- 3.5 Analizar el efecto de la OEA y la PEA en la acumulación del producto de la peroxidación lipídica MDA en la corteza frontal tras la administración de LPS.
- 4.1 Evaluar el efecto de la OEA y la PEA en la activación del eje HPA producida por la administración de LPS.
- 4.2 Evaluar el papel de la OEA y la PEA en la regulación de la temperatura corporal tras la inyección de LPS.
- 4.3 Analizar los marcadores de actividad pirógena endógena IL-1 $\beta$ , COX-2 y PGE<sub>2</sub> en el hipotálamo tras la administración sistémica de LPS y la influencia del pretratamiento con OEA y PEA.
- 4.4 Evaluar los efectos de la OEA y la PEA sobre el comportamiento motivacional (anhedonia) producido por la inyección sistémica de LPS.







# ***RESULTADOS Y DISCUSIÓN***



# *ARTÍCULO 1*

En este primer estudio, trataremos de determinar el patrón de expresión temporal de los principales mediadores pro-inflamatorios en corteza frontal y la activación del eje HPA en un modelo animal de consumo intensivo de alcohol o *binge drinking*. Una vez seleccionado el intervalo de tiempo en el que se observa un mayor incremento de los mediadores pro-inflamatorios, realizaremos un segundo experimento para definir los efectos del pretratamiento con OEA sobre la vía de señalización HMGB1/TLR4, la expresión de NF- $\kappa$ B, los niveles de mediadores pro-inflamatorios y de marcadores de daño celular tras el consumo de alcohol tipo *binge drinking*. También analizaremos la función de la OEA sobre el metabolismo del alcohol y la activación del eje HPA tras el consumo de alcohol tipo *binge drinking*.





**OLEOYLETHANOLAMIDE PREVENTS NEUROIMMUNE HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B DANGER SIGNALING, OXIDATIVE STRESS AND PRO-APOPTOTIC CASPASE-3 IN FRONTAL CORTEX AFTER ETHANOL BINGE ADMINISTRATION.**

Journal:	<i>Addiction Biology</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Antón, María; Complutense University of Madrid, Psychobiology Alen, Francisco; INSTITUTO IBIMA, UGC SALUD MENTAL; Complutense University of Madrid, Psychobiology Gómez de Heras, Raquel; Universidad Complutense, Psicobiología; Complutense University of Madrid, Psychobiology Serrano, Antonia; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga, Spain, Pavon, Francisco Javier; Instituto IBIMA, UGC Salud Mental Leza, Juan Carlos; Complutense University of Madrid, Pharmacology García-Bueno, Borja; Complutense University of Madrid, Pharmacology Rodríguez de Fonseca, Fernando; Instituto IBIMA, UGC Salud Mental Orio, Laura; Complutense University of Madrid, Psychobiology
Keywords:	alcohol binge, OEA, TLR4
Abstract:	Alcohol abuse is frequently characterized by a specific pattern of intake in binge drinking episodes, inducing neuroinflammation and brain damage. Here, we characterized the temporal profile of neuroinflammation in rats exposed to intragastric binge ethanol administrations (3 times/day x 4 days) and tested the anti-inflammatory/neuroprotectant properties of the satiety factor oleoylethanolamide (OEA). Pre-treatment with OEA (10 mg/kg, i.p.) previous each alcohol gavage blocked the expression of High mobility group box 1 (HMGB1) danger signal and the innate immunity Toll-like receptors 4 (TLR4), inhibiting the Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) proinflammatory cascade induced by alcohol binge in frontal cortex. OEA reduced the levels of Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and the enzymes cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in ethanol binged animals. Elevations in plasma Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and IL-1 $\beta$ after ethanol were also inhibited by OEA. Additionally, OEA prevented ethanol-induced lipid peroxidation, caspase-8 and pro-apoptotic caspase-3 activation in frontal cortex. Finally, OEA blocked the rise in blood corticosterone levels after ethanol with no alteration in blood ethanol levels. Altogether, results highlight a beneficial profile of OEA as a potent anti-inflammatory/neuroprotectant compound to treat alcohol abuse.

SCHOLARONE™  
Manuscripts

For Review Only

**OLEOYLETHANOLAMIDE PREVENTS NEUROIMMUNE HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B DANGER SIGNALING, OXIDATIVE STRESS AND PRO-APOPTOTIC CASPASE-3 IN FRONTAL CORTEX AFTER ETHANOL BINGE ADMINISTRATION.**

María Antón<sup>1</sup>, Francisco Alén<sup>1</sup>, Raquel Gómez de Heras<sup>1</sup>, Antonia Serrano<sup>3</sup>, Francisco Javier Pavón<sup>3</sup>, Juan Carlos Leza<sup>2</sup>, Borja García-Bueno<sup>2</sup>, Fernando Rodríguez de Fonseca<sup>3,1</sup>, Laura Orio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Psychobiology, Faculty of Psychology, Complutense University, Madrid (UCM), Spain;* <sup>2</sup>*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, UCM, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM) & Imas12, Spain;* <sup>3</sup>*Instituto de Investigación Biomédica (IBIMA), Málaga, and Red de Trastornos Adictivos (RTA), Spain.*

Corresponding author: Laura Orio, Ph.D. Department of Psychobiology, Faculty of Psychology, Complutense University of Madrid (UCM). Campus de Somosaguas s/n. 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid. Email: [lorio@psi.ucm.es](mailto:lorio@psi.ucm.es). Phone: 0034 91 394 3074.

**Running title:** OEA blocks ethanol TLR4 signaling



**ABSTRACT**

Alcohol abuse is frequently characterized by a specific pattern of intake in binge drinking episodes, inducing neuroinflammation and brain damage. Here, we characterized the temporal profile of neuroinflammation in rats exposed to intragastric binge ethanol administrations (3 times/day x 4 days) and tested the anti-inflammatory/neuroprotectant properties of the satiety factor oleoylethanolamide (OEA). Pre-treatment with OEA (10 mg/kg, i.p.) previous each alcohol gavage blocked the expression of High mobility group box 1 (HMGB1) danger signal and the innate immunity Toll-like receptors 4 (TLR4), inhibiting the Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) proinflammatory cascade induced by alcohol binge in frontal cortex. OEA reduced the levels of Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and the enzymes cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in ethanol binged animals. Elevations in plasma Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and IL-1 $\beta$  after ethanol were also inhibited by OEA. Additionally, OEA prevented ethanol-induced lipid peroxidation, caspase-8 and pro-apoptotic caspase-3 activation in frontal cortex. Finally, OEA blocked the rise in blood corticosterone levels after ethanol with no alteration in blood ethanol levels. Altogether, results highlight a beneficial profile of OEA as a potent anti-inflammatory/neuroprotectant compound to treat alcohol abuse.

**Keywords:** alcohol binge, caspase-3, HMGB1, neuroinflammation, oleoylethanolamide, TLR4

## INTRODUCTION

Binge heavy alcohol drinking is a pattern of alcohol consumption common among some alcoholics. Alcohol-induced brain damage and neurodegeneration have been proposed to occur as a result of binge drinking episodes (Obernier et al. 2002a; Agartz et al., 1999; Hunt et al., 1993), and compelling evidence indicates that alcohol binge-induced neuroinflammation may contribute to the neurotoxic effects of the drug (Crews et al., 2006; Hamelink et al., 2005; Tajuddin et al., 2014).

A 4-day binge ethanol model (12 intragastric doses), the so-called Majchrowicz binge intoxication model (Majchrowicz, 1975), and slight modifications of it, have been used extensively to describe the neuroinflammatory and neurodegenerative properties of alcohol binge drinking. For example, ethanol binge causes microglia activation, increases the Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-DNA binding activity, upregulates the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) (Obernier et al., 2002a; Knapp & Crews, 1999; Crews et al., 2006), and induces brain injury and neurodegeneration in cerebral cortex and hippocampus (Crews et al., 2000; Hamelink et al., 2005; Tajuddin et al., 2014) associated with cognitive deficits (Obernier et al., 2002b). Additionally, the above cited binge ethanol intoxicating model induces sustained high blood ethanol levels (BEL) similar to those documented in chronic alcoholics (Adachi et al., 1991; Snyder et al., 1992).

Chronic administrations of ethanol enhance NF- $\kappa$ B-related inflammatory mediators and activate Toll-like receptors (TLR)4 and TLR3 signalling pathways, inducing apoptosis, brain injury and neurodegeneration (Vallés et al., 2004; Alfonso-Loeches et al., 2010; Qin & Crews, 2012). The neuroimmune activation induced by chronic alcohol may involve the danger signaling molecule High Mobility Group Box 1 (HMGB1), which binds TLR4 (Crews et al., 2013; Zou & Crews, 2014). HMGB1 expression was increased in postmortem alcoholic orbitofrontal cortex and its levels correlated with lifetime alcohol consumption (Crews et al., 2013). Also in

humans, increases in peripheral proinflammatory cytokines such as Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ), activation of microglia and enhanced brain expression of the chemoattractant protein 1 (MCP-1) have been documented in alcohol-dependent subjects (McClain and Cohen, 1989; McClain et al. 2004; He & Crews, 2008). Inflammation was also correlated to depressive symptoms and alcohol-craving (Leclercq et al., 2012).

The endocannabinoid system has been studied for years for its anti-inflammatory and homeostatic properties. A structural analog of the endocannabinoid anandamide, the lipid mediator oleoylethanolamide (OEA), has emerged as an interesting bioactive molecule with anti-inflammatory and neuroprotectant actions in the brain. OEA was first discovered as a satiety factor with no activity at traditional cannabinoid receptors (Fu et al., 2003; Rodriguez de Fonseca et al., 2001), and growing evidence indicates that it mediates a variety of different actions through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR- $\alpha$ ). Current studies in animal models indicate that OEA may have putative neuroprotective properties against CNS disorders such as stroke (Sun et al. 2007), Parkinson's disease (Gonzalez-Aparicio et al., 2014), depression (Jin et al., 2015) or addiction (Melis et al., 2008; Bilbao et al., 2013, 2015).

Recently, we have documented potent anti-inflammatory and anti-anhedonic actions of OEA in a LPS model of neuroinflammation (Sayd et al, 2014). Interestingly, a main role for OEA in alcoholism has been also reported: OEA regulates alcohol self-administration and relapse, reduces the withdrawal symptoms of alcohol, and it is released in blood and different tissues following exposure to alcohol, presumably as a homeostatic protective mechanism (Bilbao et al., 2015). To further investigate the role of OEA in alcohol pathology we tested here the effects of OEA in the neuroimmune HMGB1/TLR4/NF-kB pro-inflammatory and danger signaling pathway in an animal model of alcohol binge drinking.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Sixty-two male Wistar rats (from Harlan, Spain) weighing 250-300g were used. Animals were housed in groups (n=4-6) on a reverse 12-hour light/dark cycle under standard conditions of temperature and humidity. Standard food (A04 SAFE, Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France) and tap water were available *ad libitum* in the home cage. All animals were maintained under constant conditions for 10 days before experiments.

All experimental protocols were adhered to the guidelines of the Animal Welfare Committee of the Universidad Complutense of Madrid following European legislation (2010/63/UE).

### Binge ethanol treatment

Animals were treated with intragastric (i.g.) ethanol 3 times per day using i.g. cannulae (16-G needle, Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.), following a slight modification of a standard paradigm of 4-day binge alcohol intoxication protocol (Obernier et al., 2002a,b) (Fig.1A). Ethanol doses were administered every 8h during a total time of 4 days. Ethanol-treated rats received an initial *loading* dose of 5 g/kg of ethanol in a solution of 30% (w/v) and then a maximum of 3 g/kg for additional doses, which were determined in base of the animals' BEL. This repeated binge-pattern ethanol paradigm maintained relatively constant intoxicating BEL in a range of sedation/ataxia (190-430 mg/dL, Table 1), according to the 6-point behavioural ethanol intoxication scale (Majchrowicz, 1975). The average dose of ethanol/rat/day (days 1-4) was 7.06 g/kg, similar to other studies (Obernier et al., 2002a,b). See Supporting Information for more details.

### Blood ethanol levels determination

To verify intoxication, BEL were ascertained in blood samples taken from tail 120 min before and after the 15:00h ethanol i.g. administration by using electrochemical detection of an enzymatic reaction with an AM1 Alcohol Analyzer (Analox Instruments, London, UK).

### **Experimental design, drug administration and tissue/plasma collection**

#### *1. Time-course of the main neuroinflammatory changes induced by the ethanol binge protocol*

Animals subjected to the 4-day ethanol binge treatment by gavage (see Fig. 1A) were sacrificed 1h, 6h and 24h after the last ethanol administration by using a lethal dose of sodium pentobarbital (300 mg/kg, i.p., Dolethal®, Spain). Brains were isolated from the skull, and meninges and blood vessels were carefully discarded. The frontal cortex was excised and frozen at -80°C until assayed. Blood was collected by cardiac puncture using trisodium citrate (3.15% w/v) as anticoagulant. Plasma was obtained by blood centrifugation (2,000 g) 15 min at 4°C and stored at -20°C until determinations.

This first experiment allowed us to observe the timing of expression of the main inflammatory markers. According to this, we designed a second experiment in which we collected the brain tissue samples in a range between 2-4h after last ethanol gavage. We chose this interval between 1h and 6h to detect, both, early changes in inflammatory parameters, i.e. TNF- $\alpha$  upregulation, as well as the activation of posterior markers, such as COX-2 expression (Fig 2).

#### *2. Effects of repeated OEA administration in the alterations in neuroinflammatory markers induced by ethanol binge exposure.*

In this second experiment we aimed to test the anti-inflammatory/neuroprotectant effects of OEA in the TLR4 signalling cascade (Fig. 1B) in a model of binge drinking alcohol abuse.

OEA (10 mg/kg, i.p.; synthesized as described in Giuffrida et al., 2000) was dissolved in vehicle (5% Tween-80 in saline) and injected 10 min before each ethanol gavage administration. A unique administration of this dose of OEA has previously shown to induce anti-inflammatory effects in the frontal cortex of rats exposed to a model of LPS-induced neuroinflammation (Sayd et al., 2014).

### **Preparation of nuclear and cytosolic extracts**

Nuclear and cytosolic protein extracts were obtained as previously published (Sayd et al., 2014). See Supporting Information for details.

### **Western blot analysis**

Brain frontal cortices were homogenized by sonication in 400  $\mu$ L of PBS (pH=7.4) mixed with a protease inhibitor cocktail (Complete, Roche®, Madrid, Spain) followed by centrifugation at 12,000g for 10 min at 4°C. Homogenates with adjusted protein levels were mixed with Laemmli sample buffer (BioRad®, CA, USA) containing  $\beta$ -mercaptoethanol (50  $\mu$ L/mL of Laemmli) and 1 mg/mL were loaded into an electrophoresis gel. Proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane (Amersham Ibérica®, Spain) with a semi-dry transfer system (Bio-Rad®, CA, USA), incubated with specific primary and secondary antibodies (see Supporting Information) and revealed by ECL™-kit (Amersham Ibérica®, Spain). Autoradiographs were quantified by densitometry (NIH ImageJ® software, National Biosciences, Lincoln, Nebraska USA) and expressed as optical density (O.D.). In all Western blot analyses, the housekeeping gene  $\beta$ -actin was used as loading control.

### **Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analysis**

Total cytoplasmic RNA was prepared from samples of frontal cortex using TRIZOL<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Aliquots were converted to cDNA using random hexamer primers. Quantitative changes in mRNA levels were estimated by RT-PCR, carried out in the presence of SYBR green probe using a 20-L reaction in a Rotor-Gene (Corbett Research<sup>®</sup>, Mortlake, NSW, Australia). See Supporting Information for additional description and sequence details of the primers used (Table 1S).

#### **HMGB1 levels, proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) and chemokine MCP-1 levels**

Levels of soluble HMGB1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and MCP-1 were determined by commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) kits (Elabscience Biotechnology Co., Ltd., China, for HMGB-1; RayBiotech<sup>®</sup>, GA, USA, for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and MCP-1). See Supporting Information for details.

#### **Plasma corticosterone levels**

Corticosterone was measured in plasma by using a commercially available kit by radioimmunoassay (R.I.A.) (Coat-a-Count<sup>®</sup>, Siemens, LA, USA). A gamma counter (Wallac Wizard 1470, Perkin Elmer, Waltham, USA) was used to measure radioactivity of the samples.

#### **NF- $\kappa$ B Transcription Factor Assay**

Nuclear extracts were used for determination of NF- $\kappa$ B transcription factor activity by using an ELISA-based kit (Cayman Chemicals<sup>®</sup>, Tallin, Estonia). Frontal cortex nuclear extracts were incubated with specific NF- $\kappa$ B p65 subunit response element probes, and p65 bounded to its response element probe was detected using a specific antibody against this subunit. Horseradish peroxidase-labeled secondary antibody was added and the binding was detected

spectrophotometrically at 450 nm. Measurement was performed according to the manufacturer's instructions. This assay is specific for p65 activation, and it does not cross-react with other NF- $\kappa$ B subunits, such as p50. Data were normalized by the amount of total protein.

### **Lipid peroxidation**

Lipid peroxides are unstable indicators of oxidative stress in cells that decompose to form more complex and reactive compounds such as 4-hydroxynonenal (4-HNE), a natural bi-product of lipid peroxidation. The levels of HNE protein adducts in lysates from cerebral cortex were measured using a 96-well OxiSelect™ HNE Adduct Competitive ELISA Kit (Cell Biolabs®, San Diego, CA, USA) (see supporting Information).

### **Measurement of caspase-3 activity**

Caspase-3 activity was determined using a fluorimetric assay kit (Abnova®, Taiwan) according to the manufacturer's protocol. This commercial kit allows the measurement of the DEVD-dependent caspase activity (see Supporting Information for details).

### **Protein assay**

Protein levels were measured using the Bradford's method based on the principle of protein-dye binding (Bradford, 1976).

### **Statistical analyses**

Data in text and figures are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA), comparing the factors [alcohol/water] versus [OEA/vehicle],



following by a Bonferroni *post hoc* test, and by one-way ANOVA following by Newman-Keuls *post hoc* test when appropriate. The BEL data were analyzed by repeated-measures 2-way ANOVA following by a Bonferroni *post hoc* test (treatment x daily determination) for both the pre-gavage and post-gavage BEL determinations. A  $p$  value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. Data were analyzed using GraphPad Prism version 5.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

For Review Only

## RESULTS

### Time-course of alcohol binge-induced pro-inflammatory markers in frontal cortex and rise in plasma corticosterone levels

Frontal cortex TNF- $\alpha$  was up-regulated 1h after ethanol administration and the cytokine content decreased 24h after treatment (Fig.2A;  $F_{(3,11)}=9.45$ ;  $p=0.0002$ ). IL-1 $\beta$  showed a tendency to be increased 1h after ethanol exposure, but data did not reach statistical significance (Fig. 2B). The expression of p65 subunit of NF-kB increased in nuclear extracts of frontal cortex 6h after ethanol treatment, and decreased 24h after the ethanol binge, when compared with the control group (Fig. 2C;  $F_{(3,11)}=20.48$ ;  $p<0.0001$ ). Levels of the NF-kB inhibitory protein *I $\kappa$ B*-alpha (*I $\kappa$ B* $\alpha$ ) remained elevated 1h, 6h and 24h after alcohol treatment in frontal cortex cytosolic extracts (Fig. 2D;  $F_{(3,13)}=6.73$ ;  $p=0.0056$ ) and the enzyme COX-2 showed an upregulation of its expression 6h after the ethanol administration. Finally, ethanol binge exposure elevated plasma corticosterone levels 1h, 6h and 24h after last administration (Fig.2E;  $F_{(3,15)}=3.91$ ;  $p=0.03$ ).

### Blood ethanol levels

BEL achieved during the experiment were in the range reported by others (Knapp & Crews et al., 1999; Obernier et al., 2002a,b; Crews et al., 2006). We studied whether OEA may modify BEL during days 2-4 of the binge treatment (Table 1). A repeated-measures two-way ANOVA detected differences between BEL across the days of the binge protocol ( $F_{(2, 17)}=10.17$ ;  $p=0.0003$ ;  $F_{(2, 17)}=15.41$ ;  $p<0.0001$ ) and showed that OEA pre-treatment did not alter the BEL achieved during days 2-4 of ethanol binge treatment neither in the pre-gavage ( $F_{(1, 17)}=0.13$ ;  $p=0.72$ , n.s.) nor in the post-gavage ( $F_{(1, 17)}=0.18$ ;  $p=0.67$ , n.s.) BEL determination. BEL were also determined immediately before tissue extraction (day 5), being  $431.98 \pm 34.90$  g/dL for the

vehicle + ethanol group and  $445.82 \pm 32.70$  g/dL for the OEA + ethanol group (Student *t*-test,  $p=0.78$ , n.s.).

### **Ethanol binge alterations in HMGB1/TLR-4 signaling pathway and effect of OEA pre-treatment**

In order to explore whether the ethanol-induced pro-inflammatory mediators such as cytokines or NF- $\kappa$ B were discharged by activation of innate immunity receptors, we checked the influence of ethanol binge in the expression of TLR4 and its endogenous activator, the danger signaling cytokine HMGB1. Additionally, we checked the TLR4 co-receptor myeloid differentiation protein-2 (MD2), and the expression of the myeloid differentiation factor 88 (MyD88), which is an adapter protein of the TLR4 intracellular signal transduction cascade.

We observed main effects of ethanol exposure and OEA pretreatment in HMGB1 expression. The increase in HMGB1 induced by ethanol binge ( $F_{(1,13)}=19.14$ ,  $p=0.0008$ ) was prevented by pre-treatment with OEA (Fig. 3A;  $F_{(1,13)}=4.58$ ,  $p=0.05$ ).

There was a main effect of ethanol binge treatment in both TLR4 mRNA (Fig. 3B;  $F_{(1,17)}=10.08$ ,  $p=0.005$ ) and protein expression (Fig. 3C;  $F_{(1,24)}=10.04$ ,  $p=0.004$ ), a main effect of OEA in TLR4 mRNA ( $F_{(1,17)}=6.08$ ,  $p=0.0246$ ) and an interaction between ethanol exposure and OEA ( $F_{(1,24)}=9.67$ ,  $p=0.0048$ ) in TLR4 protein levels. Further analyses indicated that the pre-treatment with OEA was able to reduce the ethanol-induced upregulation in TLR-4 mRNA (Fig. 3B;  $F_{(3,17)}=5.86$ ,  $p=0.0061$ ) and protein expression (Fig.3C;  $F_{(3,24)}=8.15$ ,  $p=0.0006$ ).

Ethanol exposure in a binge pattern increases the protein expression of MD2 (Fig. 3D;  $F_{(1,27)}=6.83$ ,  $p=0.0145$ ), but data of mRNA expression did not reach statistical significance (data not shown;  $F_{(1,31)}=3.79$ ,  $p=0.06$ , n.s.). Main effect of OEA pretreatment ( $F_{(1,27)}=4.24$ ,  $p=0.04$ ) and an interaction (ethanol exposure x pre-treatment) ( $F_{(1,17)}=4.57$ ,  $p=0.0418$ ) were also found

in MD2 protein levels. OEA pre-treatment inhibited the ethanol-induced increase in MD2 (Fig. 3D;  $F_{(3,30)}=5.52$ ,  $p=0.044$ ).

Ethanol binge induced a main effect in MyD88 mRNA (Fig. 3E,  $F_{(1,15)}=10.34$ ,  $p=0.0058$ ) and protein expression (Fig. 3F;  $F_{(1,30)}=9.55$ ,  $p=0.0043$ ) and an interaction (ethanol exposure x pre-treatment) was also found in MyD88 protein levels ( $F_{(1,30)}=46.40$ ,  $p=0.0394$ ). Pre-treatment with OEA inhibited the ethanol-induced increase in MyD88 protein expression (Fig. 3F;  $F_{(3,32)}=5.46$ ,  $p=0.042$ ).

#### **Effects of OEA in frontal cortex proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ ) and chemokine (MCP-1), and plasma TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and corticosterone levels.**

Ethanol binge treatment increased the expression of both TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA levels in frontal cortex, although OEA pre-treatment did not prevent this effect (Supporting Information, Fig. 1S). TNF- $\alpha$  protein levels were increased in frontal cortex of rats under the binge ethanol treatment ( $F_{(1,16)}=2.56$ ,  $p=0.1291$ ), and were not prevented by OEA (Fig. 4A;  $F_{(3,16)}=0.02$ ,  $p=0.89$ , n.s.). In plasma, we observed a robust increase in TNF- $\alpha$  levels in ethanol-treated animals ( $F_{(1,14)}=44.64$ ,  $p<0.0001$ ) and an interaction between ethanol and OEA pre-treatment ( $F_{(1,14)}=4.85$ ,  $p=0.045$ ). Further analyses indicated that OEA pre-treatment partially prevented the increase in plasma TNF- $\alpha$  observed after ethanol binge (Fig. 4B;  $F_{(3,17)}=15.59$ ,  $p<0.0001$ ).

Ethanol-treated animals showed an increase in frontal cortex IL-1 $\beta$  protein levels ( $F_{(1,16)}=4.497$ ,  $p=0.0499$ ), that was prevented by OEA pretreatment (Fig. 4C;  $F_{(1,16)}=4.22$ ,  $p=0.05$ ). In plasma, an interaction between pre-treatment with OEA and ethanol administration was observed ( $F_{(1,20)}=18.15$ ,  $p=0.0004$ ). Ethanol binge increased plasma IL-1 $\beta$  levels, an effect that was prevented by OEA (Fig. 4D;  $F_{(3,20)}=8.20$ ,  $p=0.0009$ ).

Regarding MCP-1 levels, there was an interaction between ethanol administration and OEA pretreatment ( $F_{(1,33)}=10.06$ ,  $p=0.0033$ ) and main effects of ethanol ( $F_{(1,33)}=4.69$ ,  $p=0.0377$ ) and OEA pretreatment ( $F_{(1,33)}=12.88$ ,  $p=0.0011$ ). Ethanol binge increased MCP-1 levels in frontal cortex and OEA pre-treatment prevented this effect (Fig. 4E;  $F_{(3,33)}=9.92$ ,  $p<0.0001$ ).

Finally, we tested the influence of OEA in ethanol-induced rise in corticosterone levels (Fig. 4F). Data revealed a significant effect of treatment ( $F_{(1,29)}=5.44$ ,  $p=0.00268$ ) and an interaction between ethanol binge and OEA pretreatment ( $F_{(1,29)}=4.77$ ,  $p=0.0373$ ). A rise in corticosterone levels was observed in animals exposed to the ethanol binge treatment, that was totally prevented by pre-treatment with OEA ( $F_{(3,29)}=4.21$ ,  $p=0.0136$ ). OEA did not modify plasma corticosterone levels in control animals (Fig. 4F).

#### **Effect of OEA in NF- $\kappa$ B expression and activity after ethanol binge exposure**

We explored the canonical NF- $\kappa$ B pro-inflammatory pathway in nuclear and cytosolic extracts of frontal cortex after the pharmacological treatments. There was a main effect of ethanol binge treatment in p65 mRNA levels (Fig. 5A;  $F_{(1,33)}=44.14$ ,  $p<0.0001$ ) and an interaction between ethanol treatment and OEA pretreatment ( $F_{(1,33)}=9.10$ ,  $p=0.0049$ ). Further analyses revealed that pre-administration of OEA partially prevented the ethanol-induced increase in p65 mRNA levels (Fig. 5A;  $F_{(3,36)}=19.87$ ,  $p<0.0001$ ). In the activity assay, there were main effects of alcohol exposure ( $F_{(1,16)}=6.55$ ,  $p=0.021$ ) and OEA pretreatment ( $F_{(1,16)}=16.66$ ,  $p=0.0009$ ), being the increase in p65 nuclear activity induced by ethanol counteracted by OEA pre-treatment (Fig. 5C).

Ethanol binge treatment also increased the mRNA and protein expression of I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 5B&D;  $F_{(1,35)}=50.64$ ,  $p<0.0001$ ;  $F_{(1,33)}=37.69$ ,  $p<0.0001$ ) and interacted with OEA pretreatment ( $F_{(1,33)}=8.81$ ,  $p=0.0055$ ). Pre-treatment with OEA did not counteract the increase in I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA

levels and protein expression induced by ethanol (Fig. 5B&D;  $F_{(1,35)}=0.17$ ,  $p=0.6848$  n.s.;  $F_{(1,33)}=0.17$ ,  $p=0.067$ ,  $p=0.7970$ , n.s., respectively).

#### **Effect of OEA pre-treatment in iNOS and COX-2 mRNA expression and lipid peroxidation after ethanol binge exposure.**

The activation of NF- $\kappa$ B culminates in the production of inflammatory mediators such as the inducible enzymes iNOS and COX-2. The model of ethanol binge used in this study induced a robust increase in the mRNA expression of iNOS ( $F_{(1,17)}=11.87$ ,  $p=0.0031$ ) that was completely prevented by pre-treatment with OEA (Fig. 6A;  $F_{(1,17)}=8.71$ ,  $p=0.0089$ ). The maximal expression of COX-2 observed after ethanol treatment in the time-course experiment took place 6h after the end of the binge protocol (see back Fig. 2F), which might explain the absence of a significant effect of ethanol in the regulation of the COX-2 mRNA in the second experiment, in which brain samples were collected between 2-4h after the end of the last ethanol administration (Fig. 6B;  $F_{(1,32)}=0.07$ ,  $p=0.7975$ , n.s.). However, the 2-way ANOVA detected a main effect of OEA pre-treatment ( $F_{(1,32)}=7.17$ ,  $p=0.0011$ ) and an interaction (ethanol x OEA) ( $F_{(1,32)}=6.94$ ,  $p=0.0129$ ). Subsequent analyses revealed that OEA decreased mRNA COX-2 levels in ethanol but not vehicle-treated animals (Fig. 6B;  $F_{(3,32)}=4.26$ ,  $p=0.0123$ ).

As a result of an overactivation of pro-inflammatory pathways, the mechanisms for oxidative cellular stress may be activated inducing the formation of lipid peroxides that will affect the cell viability. We checked in our experiments the formation of the HNE adduct, a reactive compound formed by decomposition of lipid peroxides. We observed an increase in the HNE formation in frontal cortex of animals exposed to the ethanol binge treatment (Fig. 6C;  $F_{(1,15)}=14.56$ ,  $p=0.0017$ ) and an effect of OEA pretreatment ( $F_{(1,15)}=7.21$ ,  $p=0.017$ ). OEA decreased the formation of HNE, being the effect significant only in ethanol-treated animals (Fig. 6C; ( $F_{(3,18)}=7.03$ ,  $p=0.0036$ ).

### Effects of OEA in caspase-8 and pro-apoptotic caspase-3 after ethanol binge treatment.

We studied whether the induction of the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling cascade by ethanol culminated in neuronal damage. We checked the expression and activity of the pro-apoptotic enzyme caspase-3 in frontal cortices of animals under the different pharmacological treatments, and the upregulation of caspase-8 as an intermediate in the TLR4-MyD88/caspase-3 signaling pathway.

Caspase-8 mRNA was upregulated by ethanol binge ( $F_{(1,15)}=13.37$ ,  $p=0.0023$ ), and OEA pretreatment reverted this effect (Fig. 6D;  $F_{(3,18)}=6.95$ ,  $p=0.0037$ ). Caspase-3 mRNA was upregulated by alcohol, but OEA was not able to prevent this effect (Fig. S2, Supporting Information). Regarding caspase-3 protein levels (Fig. 6E), we observed an interaction between alcohol exposure and OEA pre-treatment ( $F_{(1,15)}=7.95$ ,  $p=0.0129$ ) and a main effect of ethanol ( $F_{(1,15)}=12.30$ ,  $p=0.0032$ ). Further analyses indicated that pretreatment with OEA prevented the overexpression of caspase-3 induced by ethanol (Fig. 6E;  $F_{(3,18)}=7.29$ ,  $p=0.0031$ ). Additionally, the ethanol binge treatment induced an increase in the activity of caspase-3 in frontal cortex ( $F_{(1,32)}=20.98$ ,  $p<0.0001$ ), that was reverted by pretreatment with OEA (Fig. 6F;  $F_{(1,32)}=4.744$ ,  $p=0.0369$ ).

## DISCUSSION

In this study we described the time-course of neuroinflammation induced by ethanol binge intoxication and we provided evidence of the anti-inflammatory and neuroprotectant

effects induced by OEA. Our results indicate that OEA interfered with the neuroimmune HMGB1/TLR4/MyD88 danger signaling associated with NFkB-mediated pro-inflammatory cascade and protected against the overactivity of the pro-apoptotic enzyme caspase-3 in rat frontal cortex, all elicited by ethanol binge intoxication. Additionally, OEA inhibited the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activation under alcohol binge exposure with no alteration in the ethanol metabolism.

One of the main findings of the present study was that OEA pretreatment affected the expression and signaling of innate immune receptors TLR4 under alcohol intoxicating conditions. Recent evidences indicate that alcohol recruits and activates TLR4 in cerebral cortex (Crews et al., 2013; Alfonso-Loeches et al., 2010) including the prefrontal cortex (Pascual et al., 2014; Vetreno & Crews, 2012), specifically in glial cells (Blanco et al., 2005; Fernandez-Lizarbe et al., 2013). Ethanol-induced TLR4 signalling triggers the induction of a cascade of pro-inflammatory mediators that affect myelination (Alfonso-Loeches et al., 2012; Montesinos et al., 2015), induce brain damage (Alfonso-Loeches et al., 2010, Fernandez-Lizarbe et al., 2013), cognitive impairments (Pascual et al., 2011, 2014; Montesinos et al., 2015) and anxiety-related behaviors (Pascual et al., 2015) associated with the drug abuse. Increased expression of TLR2, TLR3 & TLR4 has been observed in human brains of alcoholics and in mice treated chronically with ethanol (Crews et al., 2013). The mechanisms underlying ethanol activation of TLR4 may include, apart from the direct activation, the recruitment of the nuclear cytokine HMGB1 that is released from neurons to the extracellular space inducing stimulation of both glial and neuronal TLR4. The binding of HMGB1 to TLR4 in glial cells activates a cascade of pro-inflammatory mediators and induce the expression and release of more HGMB1, which magnifies the inflammatory response (Crews et al, 2013; Zou & Crews, 2014). It has been described that HMGB1/TLR4 signaling increased brain neuroimmune activation in alcohol dependence (Crews et al, 2013) and has been associated with cognitive deficits (Mazarati et al., 2011). Another mechanism for ethanol activation of TLR4 may involve



an increase in the intestinal permeability to endotoxins, since elevated levels of blood LPS (which is a TLR4 ligand) and leaky gut have been documented in alcohol-dependent animals and alcohol-dependent non-cirrhotic humans (Adachi et al., 1995; Leclercq et al., 2012). Indeed, LPS administration greatly increased the neuroinflammatory effects of ethanol in brain and blood (Qin et al., 2008) and sensitized ethanol-induced anxiety during withdrawal (Breese et al., 2008). We have previously showed that OEA blocks the frontal cortex NF- $\kappa$ B-dependent neuroinflammatory pathway induced by LPS and counteracts the anhedonic-like behavior associated with neuroinflammation (Sayd et al., 2014). In the present study, we proved that one of the mechanisms by which OEA may exert its anti-inflammatory and protective actions in the brain is by blocking the activation of the innate immune system, specifically through HMGB1/TLR4 signalling cascade inhibition associated with cell damage. Whether OEA may alter the gut permeability for endotoxins reducing peripheral inflammation after ethanol abuse remains to be determined in future investigations.

Mechanisms by which ethanol injures the brain may include inflammation-derived oxidative stress and corticosterone production. Oxidative stress has been proposed as a major factor for alcohol-associated neurobiological effects (Hamelink et al., 2005; Haorah et al., 2008; Collins et al., 2014). Due to the suggested role of inflammation and oxidative stress in alcohol-induced brain damage, several antioxidants have been tested as neuroprotectant drugs for alcohol abuse. Interestingly, only some of them have been proven to be effective preventing alcohol-induced damage. Butylated hydroxytoluene (BHT) inhibited NF- $\kappa$ B nuclear activity and prevented the brain damage induced by ethanol in the 4-day binge intoxicating model (Crews et al., 2006). The diuretic furosemide and the non psychoactive cannabinoid Cannabidiol protected against ethanol brain damage by an antioxidant effect (Collins et al., 1998; Hamelink et al., 2005). The docosahexaenoic acid reduced neuroinflammation, oxidative stress and ethanol-induced neurodegeneration in the same ethanol binge model used in the present study (Tajuddin et al., 2014). However, the antioxidant ebselen and a blueberry extract

failed to afford neuroprotection against ethanol binge-induced brain damage (Crews et al., 2006), and there are contradictory results for the effect of  $\alpha$ -tocofecol (Hamelink et al., 2005; Crews et al., 2006). Chronic alcohol-induced cognitive deficits were abrogated by antioxidants (Tiwari & Chopra, 2013). In our ethanol binge study, OEA showed a similar antioxidant profile, reducing oxidative and nitrosative stress. Additionally, we showed that OEA decreased the ethanol-induced rise in blood corticosterone levels. Altogether, these results suggest a predominant role for oxidative stress and HPA axis activation in the neuronal damage induced by alcohol binge. The inhibition of blood corticosterone levels induced by OEA may be protective for the neurodegeneration induced by ethanol, since it has been shown that elevated circulating corticosterone partially mediates ethanol binge-induced neurotoxicity in the brain (Cippitelli et al., 2014). In line with our results, OEA normalized the hyperactivity of the HPA axis after chronic unpredictable mild stress (Jin et al., 2015).

We described that ethanol binge intoxication induced the release of proinflammatory cytokines in brain and blood. The effects of OEA in cytokine reduction were observed both at central and peripheral levels. The fact that the study with OEA was done in an interval in which brain TNF- $\alpha$  levels after ethanol binge were modest (because they were measured at a time-point in the descending curve of the cytokine expression) may explain the absence of OEA effect in cortical TNF- $\alpha$  levels, while the peak of blood TNF- $\alpha$  levels was substantial to appreciate the inhibitory effect of OEA. In line with this hypothesis, we observed that OEA reduced both plasma and frontal cortex TNF- $\alpha$  under neuroinflammatory experimental conditions (Sayd et al., 2014) and it has been proven that OEA crosses the blood brain barrier after i.p. administration (Gonzalez-Aparicio et al., 2014). Additionally, increases in the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  have been linked to brain HMGB1/TLR4 activity altered by ethanol (Crews et al., 2012; Zhou & Crews, 2014).

OEA blocked the expression and activity of the p65 subunit of NF- $\kappa$ B, which mediates most of the transcriptional activity of this nuclear factor, with no significant effect in the NF- $\kappa$ B inhibitory protein I $\kappa$ B $\alpha$ . The translocation of NF- $\kappa$ B p65 subunit to the nucleus induces the transcription of more pro-inflammatory cytokines, which are released to the cytoplasm and activate NF- $\kappa$ B again in an amplified inflammatory loop. NF- $\kappa$ B transcriptional activity involves also the production of MCP-1, which induces immune cells migration to damaged cells. We observed that OEA reduces, not only IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , but also MCP-1 production. This finding may reveal unknown properties of OEA for the treatment of Wernicke's encephalopathy, a neuropsychiatric condition associated with alcoholism, since thiamine (vitamin B1) deficiency, a core element for the disorder, has been correlated with brain levels of MCP-1 (Zahr et al., 2014), which caused microglia recruitment/activation and exacerbated neurodegeneration (Yang et al., 2011).

Ethanol-induced NF- $\kappa$ B activity increased also the expression of the enzymes COX-2 and iNOS, and the production of the oxidative stress marker 4-HNE, which were blocked by OEA pretreatment. According to our results, other studies showed increased COX-2 immunostaining in frontal cortex of rats exposed to the binge ethanol intoxicating model (Knapp & Crews, 1999) and increased 4-HNE adduct formation following the 4-day intoxicating ethanol binge protocol (Tajuddin et al., 2014). This model of alcohol binge intoxication and its slight modifications have shown to activate phospholipase A2 (PLA2) and mobilize arachidonic acid (AA), resulting in ROS production and oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration (Collins et al., 2014). The increase in frontal cortex COX-2 levels reported here and by other authors (Knapp & Crews, 1999) after ethanol binge intoxication may be partially explained by the increase in AA, which is the COX-2 substrate in the production of prostaglandins.

Another relevant finding of our study is the potential ability of OEA to suppress the overactivity of the pro-apoptotic enzyme caspase-3 under stimulated conditions. We observed

that ethanol binge induced an upregulation of caspase-3 expression and activity in frontal cortex, which were both inhibited by the pre-treatment with OEA. This finding reveals an up to date undescribed mechanism that OEA may use to protect the brain. Precisely, NF $\kappa$ B-mediated caspase-3 apoptotic signaling has been related with the cognitive deficits associated with ethanol exposure (Tiwari et al., 2012; Tiwari & Chopra, 2013). Recent studies indicate that OEA may act as a homeostatic signal that regulates multiple physiological adaptations after brain insults. Indeed, increased OEA levels have been documented after several CNS pathologies, including ethanol addiction (Bilbao et al., 2015). Thus, an exogenous administration of OEA (Sayd et al., 2014) or an increased bioavailability of it (Ribeiro et al., 2015) might serve as a potent strategy to suppress inflammation and as a neuroprotective pharmacologic maneuver. The neuroinflammation induced by ethanol may play a role in the pathology of ethanol addiction, since activation of inflammatory signaling by LPS increased ethanol drinking (Blednov et al., 2011). OEA regulates multiple physiological adaptations after ethanol abuse, including reduction of ethanol self-administration and relapse (Bilbao et al., 2015), ethanol-induced neuroinflammation and brain damage (this study) or attenuation of the withdrawal symptoms after ethanol intake (Bilbao et al., 2015). Collectively, these results highlight the beneficial profile of OEA as a pharmacotherapy for different aspects of ethanol abuse.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study has been supported by the Spanish Ministry of Health and Social Policy (Plan Nacional sobre Drogas, PR29/11-18295 to LO) and the Regional Government of Madrid (S2011/BMD-2308. CANNAB to JCL). BGB hold a Ramón y Cajal research contract (Spanish Ministry of Education and Science). The authors state no competing financial interest.

#### AUTHORS CONTRIBUTION

MA performed all biochemical studies; MA, FA and RGH participated in the behavioral studies, tissue/blood extractions and BEL determinations; AS and FJP synthesized the OEA; BGB participates in the study design, acquisition of data and revision of the manuscript; JCJ and FRF provided methodological support and supervised the manuscript for intellectual content; LO designed the study, performed experiments and statistical analysis, and wrote the manuscript.

For Review Only

## REFERENCES

- Adachi J, Mizoi Y, Fukunaga T, Ogawa Y, Ueno Y & Imamichi, H (1991) Degrees of alcohol intoxication in 117 hospitalized cases. *J Stud Alcohol* 52: 448-453.
- Agartz I, Momenan R, Rawlings RR, Kerich MJ & Hommer DW (1999) Hippocampal volume in patients with alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 56: 356-363.
- Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I & Guerri C (2010) Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J Neurosci* 30: 8285-8295.
- Bilbao A, Blanco E, Luque-Rojas MJ, Suarez J, Palomino A, Vida M, Araos P, Bermudez-Silva FJ, Fernandez-Espejo E, Spanagel R & Rodriguez de Fonseca F (2013) Oleoylethanolamide dose-dependently attenuates cocaine-induced behaviours through a PPARalpha receptor-independent mechanism. *Addict Biol* 18: 78-87.
- Bilbao A, Serrano A, Cippitelli A, Pavón FJ, Giuffrida A, Suárez J, García-Marchena N, Baixeiras E, Gómez de Heras R, Orio L, Alén F, Ciccocioppo R, Cravatt BF, Parsons LH, Piomelli D, Rodríguez de Fonseca F (2015) Role of the Satiety Factor Oleoylethanolamide in Alcoholism. *Addiction Biology* (in press).
- Blednov YA, Benavidez JM, Geil C, Perra S, Morikawa H & Harris RA (2011) Activation of inflammatory signaling by lipopolysaccharide produces a prolonged increase of voluntary alcohol intake in mice. *Brain Behav Immun* 25 Suppl 1: S92-S105.
- Breese GR, Knapp DJ, Overstreet DH, Navarro M, Wills TA & Angel RA (2008) Repeated lipopolysaccharide (LPS) or cytokine treatments sensitize ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 33: 867-876.
- Cippitelli A, Damadzic R, Hamelink C, Brunnuell M, Thorsell A, Heilig M & Eskay RL (2014) Binge-like ethanol consumption increases corticosterone levels and neurodegeneration whereas occupancy of type II glucocorticoid receptors with mifepristone is neuroprotective. *Addict Biol* 19:27-36.
- Collins MA, Tajuddin N, Moon KH, Kim HY, Nixon K & Neafsey E.J (2014) Alcohol, phospholipase A2-associated neuroinflammation, and omega3 docosahexaenoic acid protection. *Mol Neurobiol* 50:239-245.
- Collins MA, Zou JY & Neafsey EJ (1998) Brain damage due to episodic alcohol exposure in vivo and in vitro: furosemide neuroprotection implicates edema-based mechanism. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 12:221-230.
- Crews F, Nixon K, Kim D, Joseph J, Shukitt-Hale B, Qin L & Zou J (2006) BHT blocks NF-kappaB activation and ethanol-induced brain damage. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1938-1949.
- Crews FT, Braun CJ, Hoplight B, Switzer RC, 3rd & Knapp DJ (2000) Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. *Alcohol Clin Exp Res* 24:1712-1723.

Crews FT, Collins MA, Dlugos C, Littleton J, Wilkins L, Neafsey EJ, Pentney R, Snell LD, Tabakoff B, Zou J & Noronha A (2004) Alcohol-induced neurodegeneration: when, where and why? *Alcohol Clin Exp Res* 28: 350-364.

Crews, F.T., Qin, L., Sheedy, D., Vetreno, R.P. & Zou, J. (2013) High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence. *Biol Psychiatry* 73:602-612.

Fernandez-Lizarbe, S., Montesinos, J. & Guerri, C. (2013) Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *J Neurochem* 126: 261-273.

Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G & Piomelli D (2003) Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature* 425: 90-93.

Gonzalez-Aparicio R, Blanco E, Serrano A, Pavon FJ, Parsons LH, Maldonado R, Robledo P, Fernandez-Espejo E & de Fonseca FR (2014) The systemic administration of oleylethanolamide exerts neuroprotection of the nigrostriatal system in experimental Parkinsonism. *Int J Neuropsychopharmacol* 17: 455-468.

Hamelink C, Hampson A, Wink DA, Eiden LE & Eskay RL (2005) Comparison of cannabidiol, antioxidants, and diuretics in reversing binge ethanol-induced neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 780-788.

Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B & Persidsky Y (2008) Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free radical biology & medicine* 45: 1542-1550.

He J & Crews FT (2008) Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp Neurol* 210: 349-358.

Hunt WA (1993) Are binge drinkers more at risk of developing brain damage? *Alcohol* 10: 559-561.

Jin P, Yu HL, Tian L, Zhang F & Quan ZS (2015) Antidepressant-like effects of oleylethanolamide in a mouse model of chronic unpredictable mild stress. *Pharmacol Biochem Behav* 133: 146-154.

Knapp DJ & Crews FT (1999) Induction of cyclooxygenase-2 in brain during acute and chronic ethanol treatment and ethanol withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 23: 633-643.

Leclercq S, Cani PD, Neyrinck AM, Starkel P, Jamar F, Mikolajczak M, Delzenne NM & de Timary P (2012) Role of intestinal permeability and inflammation in the biological and behavioral control of alcohol-dependent subjects. *Brain Behav Immun* 26: 911-918.

Majchrowicz E (1975) Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. *Psychopharmacologia* 43: 245-254.

McClain CJ & Cohen DA (1989) Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 9: 349-351.

McClain CJ, Song Z, Barve SS, Hill DB & Deaciuc I (2004) Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G497-502.

- Melis M, Pillolla G, Luchicchi A, Muntoni AL, Yasar S, Goldberg SR & Pistis M. (2008) Endogenous fatty acid ethanolamides suppress nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptors. *J Neurosci* 28: 13985-13994.
- Montesinos, J., Pascual, M., Pla, A., Maldonado, C., Rodriguez-Arias, M., Minarro, J. & Guerri, C. (2015) TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *Brain Behav Immun* 45: 233-244.
- Obernier JA, Bouldin TW & Crews FT (2002a) Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcohol Clin Exp Res* 26: 547-557.
- Obernier JA, White AM, Swartzwelder HS & Crews FT (2002b) Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 521-532.
- Pascual, M., Balino, P., Alfonso-Loeches, S., Aragon, C.M. & Guerri, C. (2011) Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain Behav Immun* 25 Suppl 1: S80-91.
- Pascual, M., Balino, P., Aragon, C.M. & Guerri, C. (2015) Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology* 89: 352-359.
- Pascual, M., Pla, A., Minarro, J. & Guerri, C. (2014) Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive dysfunction: a review with reference to human adolescent drinking. *Alcohol Alcohol* 49: 187-192.
- Plaza-Zabala A, Berrendero F, Suarez J, Bermudez-Silva FJ, Fernandez-Espejo E, Serrano A, Pavon FJ, Parsons LH, De Fonseca FR, Maldonado R, Robledo P. (2010) Effects of the endogenous PPAR-alpha agonist, oleoylethanolamide on MDMA-induced cognitive deficits in mice. *Synapse* 64(5):379-89.
- Qin L & Crews FT (2012) NADPH oxidase and reactive oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 9:5.
- Ribeiro A, Pontis S, Mengatto L, Armirotti A, Chiurchiu V, Capurro V, Fiasella A, Nuzzi A, Romeo, E, Moreno-Sanz G, Maccarrone M, Reggiani A, Tarzia G, Mor M, Bertozzi F, Bandiera T & Piomelli D (2015) A Potent Systemically Active N-Acylethanolamine Acid Amidase Inhibitor that Suppresses Inflammation and Human Macrophage Activation. *ACS Chem Biol*.
- Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodriguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C & Piomelli D. (2001) An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 414: 209-212.
- Sayd A, Anton M, Alen F, Caso JR, Pavon J, Leza JC, Rodriguez de Fonseca F, Garcia-Bueno B & Orio L (2014) Systemic administration of oleoylethanolamide protects from neuroinflammation and anhedonia induced by LPS in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*: 18.
- Snyder H, Williams D, Zink B. & Reilly K (1992) Accuracy of blood ethanol determination using serum osmolality. *J Emerg Med* 10: 129-133.
- Sun Y, Alexander SP, Garle MJ, Gibson CL, Hewitt K, Murphy SP, Kendall DA & Bennett AJ (2007) Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol* 152: 734-743.



- Tajuddin N, Moon KH, Marshall SA, Nixon K, Neafsey EJ, Kim HY & Collins MA (2014) Neuroinflammation and neurodegeneration in adult rat brain from binge ethanol exposure: abrogation by docosahexaenoic acid. *PLoS One* 9:e101223.
- Tiwari M, Kotwal J, Kotwal A, Mishra P, Dutta V & Chopra S (2013) Correlation of haemoglobin and red cell indices with serum ferritin in Indian women in second and third trimester of pregnancy. *Medical journal, Armed Forces India* 69: 31-36.
- Tiwari V & Chopra K (2012) Attenuation of oxidative stress, neuroinflammation, and apoptosis by curcumin prevents cognitive deficits in rats postnatally exposed to ethanol. *Psychopharmacology (Berl)* 224: 519-535.
- Tiwari V & Chopra K (2013) Resveratrol abrogates alcohol-induced cognitive deficits by attenuating oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in the adult rat brain. *Neurochemistry international* 62:861-869.
- Valles SL, Blanco AM, Pascual M & Guerri C (2004) Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol* 14:365-371.
- Vetreno RP & Crews FT (2012) Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and Toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. *Neuroscience* 226: 475-488.
- Yang, G., Meng, Y., Li, W., Yong, Y., Fan, Z., Ding, H., Wei, Y., Luo, J. & Ke, Z.J. (2011) Neuronal MCP-1 mediates microglia recruitment and neurodegeneration induced by the mild impairment of oxidative metabolism. *Brain Pathol* 21: 279-297.
- Zahr, N.M., Alt, C., Mayer, D., Rohlfing, T., Manning-Bog, A., Luong, R., Sullivan, E.V. & Pfefferbaum, A. (2014) Associations between in vivo neuroimaging and postmortem brain cytokine markers in a rodent model of Wernicke's encephalopathy. *Exp Neurol* 261: 109-119.
- Zou, J.Y. & Crews, F.T. (2014) Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling. *PLoS One* 9: e87915.

**Table 1. Blood ethanol levels**

TREATMENT	Time of blood collection	Day 2 BEL (g/dL)	Day 3 BEL (g/dL)	Day 4 BEL (g/dL)	
Vehicle + EtOH	13:00	193.29 ± 38.22	341.73 ± 32.48**	303.32 ± 37.17*	N=10
	17:00	274.96 ± 27.17	422.35 ± 18.00***	430.31 ± 19.72***	N=10
OEA + EtOH	13:00	217.14 ± 41.58	342.57 ± 40.25*	320.68 ± 36.63	N=9
	17:00	321.88 ± 34.08	404.17 ± 27.65	429.76 ± 29.25*	N=9

**Table 1. Blood ethanol levels.** Data represent BEL 2h before and 2h after the 15:00h alcohol administration in vehicle or OEA pre-treated animals. There were differences in the BEL between the day 2 and days 3 or 4 of treatment in both groups. Pretreatment with OEA did not modify the BEL achieved during days 2-4 of alcohol binge treatment neither before nor after ethanol gavage. Results are expressed as means ± S.E.M. Different from day 2 in the same treatment group: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ . [EtOH: ethanol; OEA: oleoylethanolamide; BEL: blood ethanol levels].

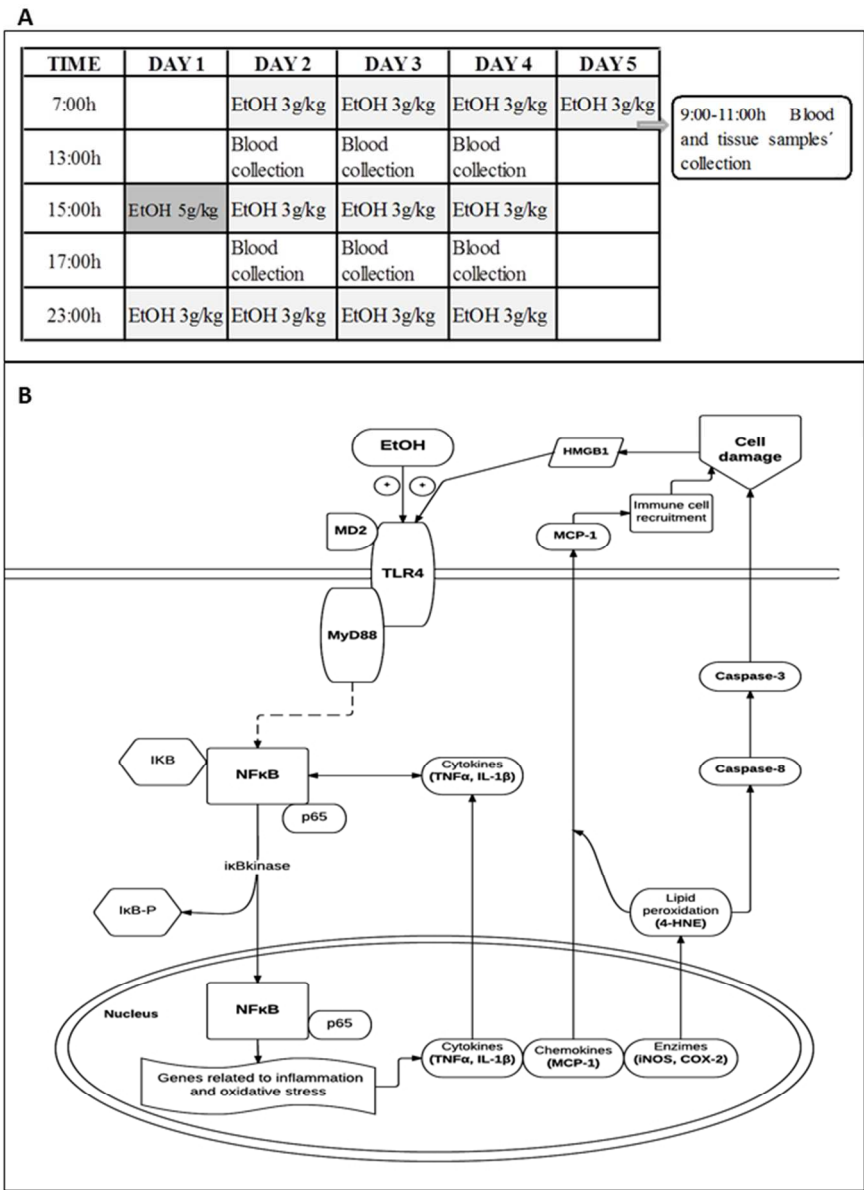


Figure 1. Experimental design of the study. A) Binge alcohol drinking experimental protocol. Rats received an initial loading dose of 5 g/kg of 30% ethanol (w/v) via oral gavage and a maximum of 3 g/kg of ethanol in each subsequent dose every 8h. Blood was collected from the tail vein 2h before and 2h after of the 15:00h ethanol gavage administration on days 2 to 4 in order to determine blood ethanol levels (BEL), and the ethanol doses were titrated to maintain relatively constant intoxicating BEL (see Table 1). The average doses of ethanol/rat were 8 g/kg, 7.5 g/kg, 7.9 g/kg and 4.9 g/kg, for days 1 to 4, respectively, and the average dose of ethanol/rat/day(1-4) was 7.06 g/kg. In the second experiment, OEA (10 mg/kg, i.p.) was injected as pre-treatment 10 min before each ethanol gavage. Blood and brain tissue samples were collected 2-4h after last ethanol administration. B) Proposed HMGB1-mediated neuroimmune TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway activated by alcohol, leading to oxidative stress, caspase-3 activation and cell damage. HMGB1 is a danger cytokine recruited by alcohol that activates immune MyD88-dependent TLR4 signaling pathway, which induces the NF-κB p65 subunit translocation to the nucleus and increase in its transcriptional activity. The NF-κB-mediated pro-inflammatory cascade involves the release of cytokines,

such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , that induce more NF- $\kappa$ B activation and further neuroinflammation, and the chemokine MCP-1 (that is also induced by impaired oxidative stress), which mediates microglia recruitment and exacerbates neurodegeneration. NF- $\kappa$ B transcriptional activity induces the expression of other pro-inflammatory markers, such as COX-2 and iNOS, leading to oxidative and nitrosative stress. Lipid peroxidation, measured by 4-HNE accumulation, induces a cellular redox status related with caspase-8-mediated activation of caspase-3 and apoptotic cell death.

[HMGB1: High mobility group box 1; TLR4: Toll-like receptors 4; MD2: myeloid differentiation protein-2; MyD88: myeloid differentiation factor 88; NF- $\kappa$ B: nuclear factor-kappa B transcription factor (subunit p65); IkB: IkappaB inhibitory protein; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha; IL-1 $\beta$ : interleukin-1beta; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; iNOS: inducible nitric oxide synthase; COX-2: cyclooxygenase-2; 4-HNE: 4-hydroxynonenal].

190x254mm (96 x 96 DPI)

For Review Only

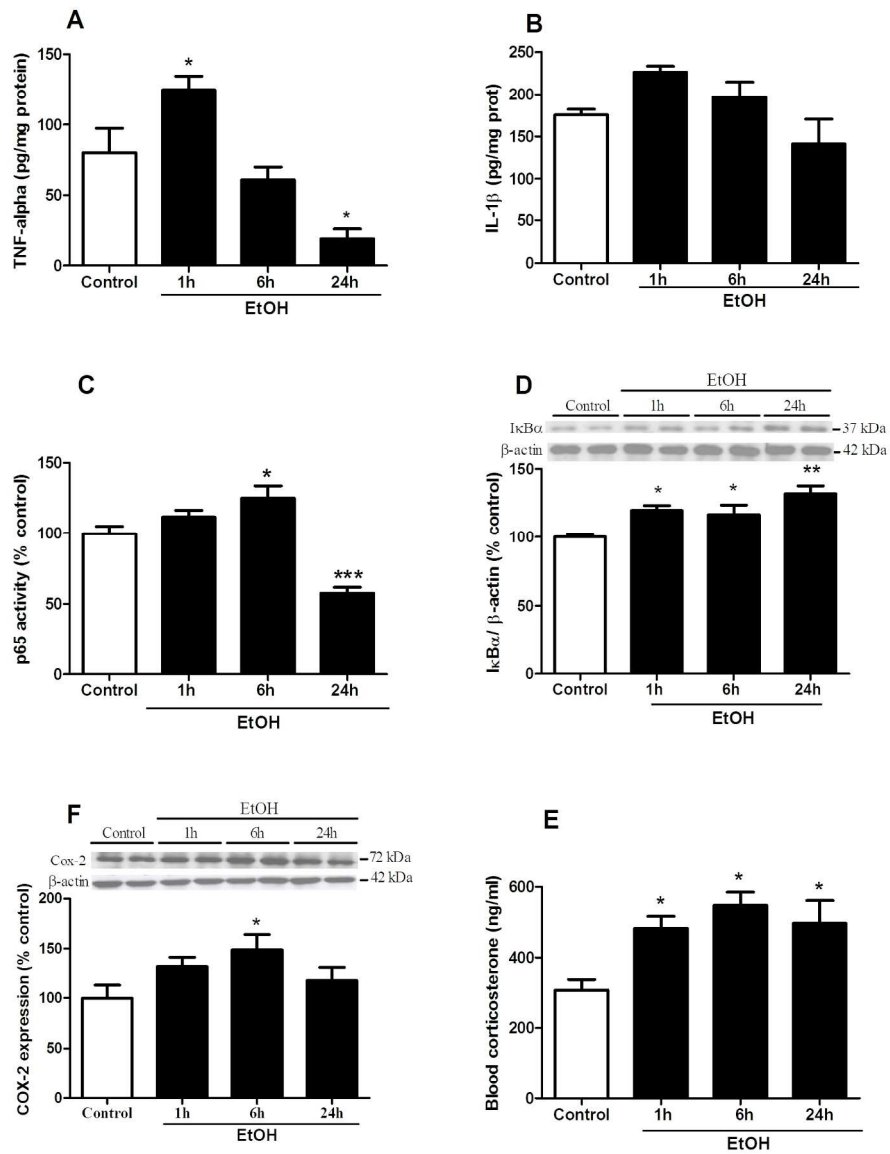


Figure 2. Time-course of ethanol binge drinking-induced rise in frontal cortex proinflammatory mediators and blood corticosterone. A) TNF- $\alpha$  levels in frontal cortex were upregulated 6h after binge treatment and downregulated 24h post-treatment; B) IL-1 $\beta$  levels after ethanol binge treatment showed a tendency to increase but were not significantly elevated; C) the activity of p65 subunit of NF $\kappa$ B was increased and decreased in frontal cortex nuclear extracts 6h and 24h after ethanol binge, respectively; D) the levels of IkB $\alpha$  were elevated at all times tested after ethanol binge treatment; F) the enzyme COX-2 was upregulated 6h after ethanol exposure; E) ethanol binge treatment increased blood corticosterone levels 1h, 6h and 24h after last ethanol gavage. Data represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=3-6). Different from control group: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.  
184x233mm (300 x 300 DPI)

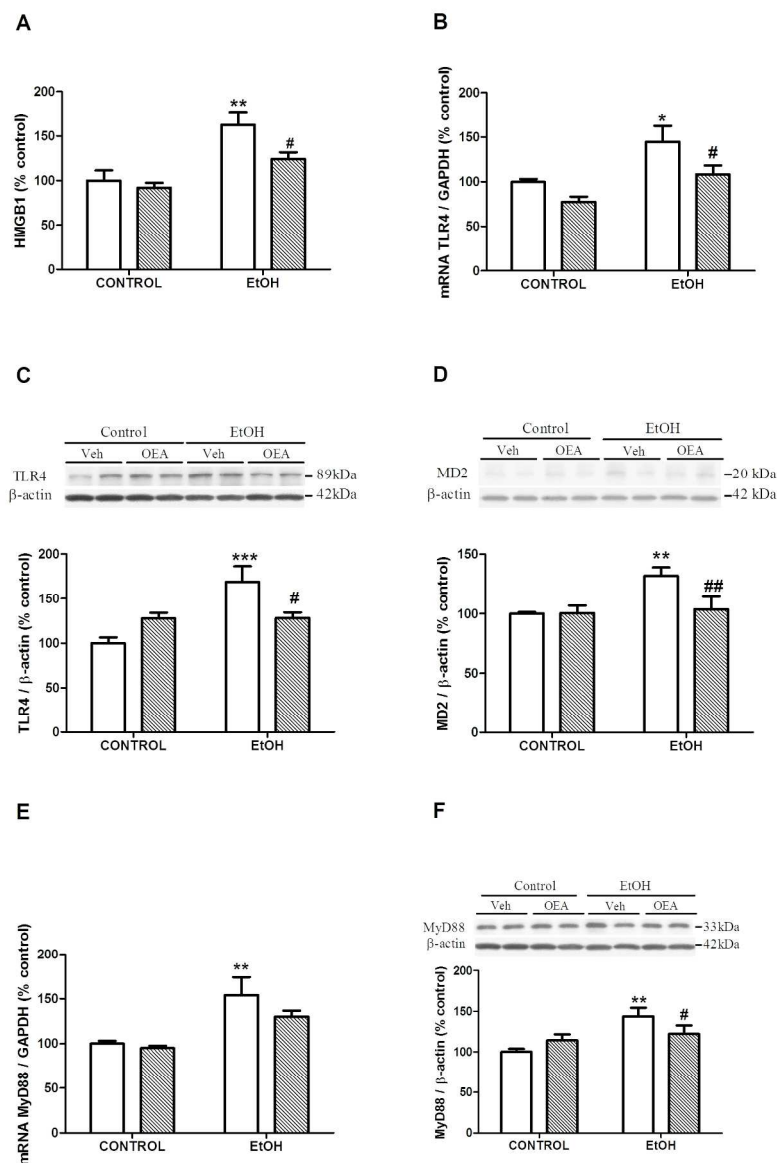


Figure 3. Effects of pretreatment with OEA in the HMGB1/TLR4 signaling pathway activated by ethanol binge exposure in frontal cortex. A) HMGB1 levels measured by enzyme-linked immunosorbent assays; B) mRNA relative levels of TLR4; C) protein TLR4 levels; D) protein levels of MD2; E) mRNA relative levels of MyD88; F) protein levels of MyD88. Data represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=4-10). mRNA levels were normalized by GAPDH and densitometric data in the western blot analyses of bands of interest were normalized by  $\beta$ -actin (lower band). Different from control group: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Different from ethanol-treated animals: # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ .  
189x273mm (300 x 300 DPI)

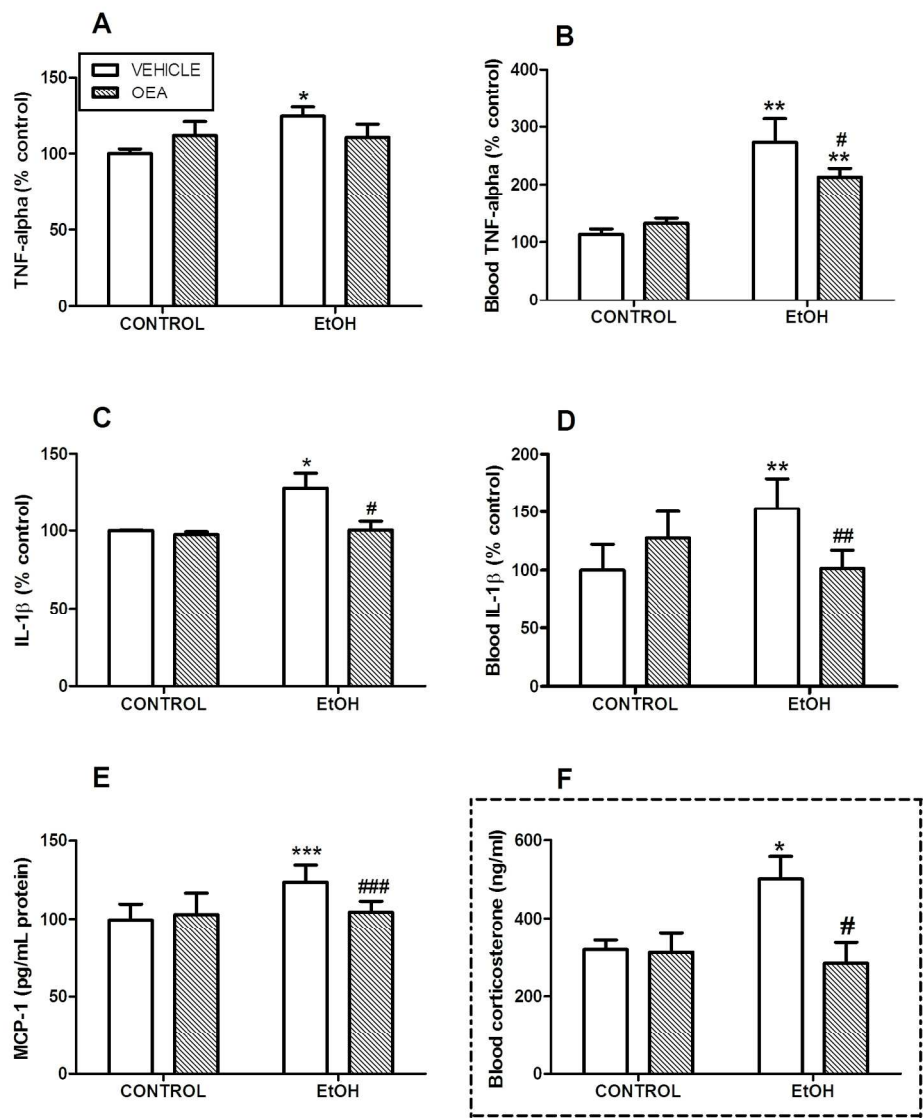


Figure 4. Release of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and MCP-1 in frontal cortex, and plasma levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and corticosterone after pharmacological treatments. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) data of frontal cortex levels of TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (C) and MCP-1 (E). ELISA-detected plasma levels of TNF- $\alpha$  (B) and IL-1 $\beta$  (D), and corticosterone levels (F) detected by radioimmunoassay (R.I.A.). Data represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=3-6). Different from control group: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. Different from ethanol-treated animals: #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.001.

174x201mm (300 x 300 DPI)

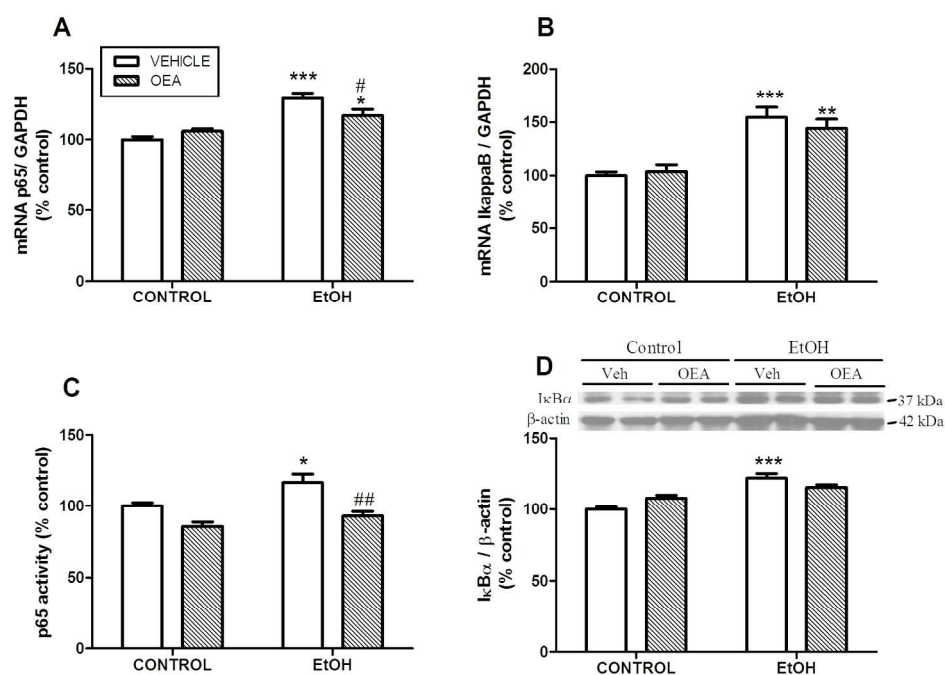


Figure 5. Activation of frontal cortex NFκB induced by ethanol binge exposure and effects of OEA pre-treatment. A) mRNA relative levels of nuclear p65 subunit of NFκB; B) mRNA levels of cytosolic NFκB inhibitory protein IkBα; C) p65 nuclear activity measured by an ELISA-based kit; D) protein levels of IkBα in cytosolic extracts. Data represents the mean ± S.E.M. (n=4-10). Densitometric data of IkBα were normalized by β-actin (lower band). Different from control group: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Different from ethanol-treated animals: #p<0.05; ##p<0.01.

190x136mm (300 x 300 DPI)



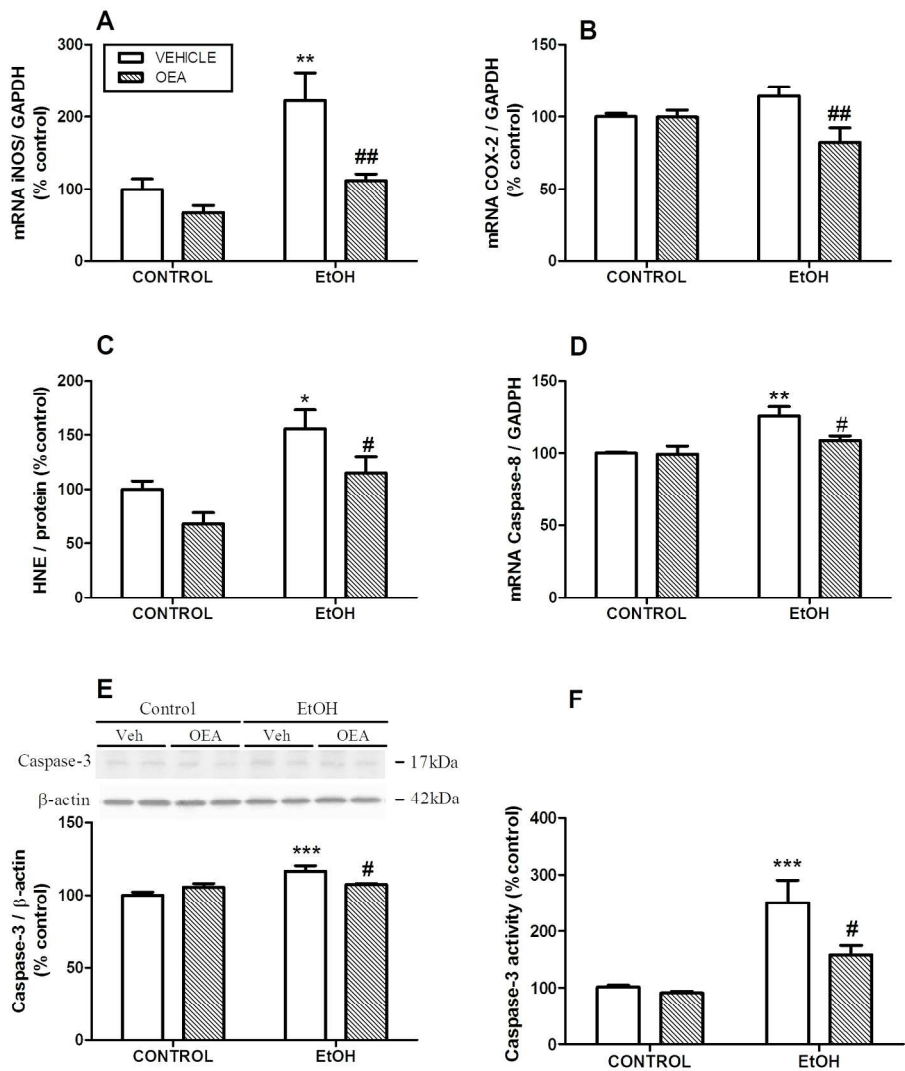


Figure 6. Role of OEA in ethanol-induced upregulation of iNOS and COX-2, lipid peroxidation, caspase 8, and caspase-3 expression and activity in frontal cortex. A) mRNA relative levels of iNOS; B) mRNA relative levels of COX-2; C) relative levels of 4-hydroxynonenal (4-HNE), a natural product of lipid peroxidation; D) mRNA relative levels of caspase-8, a signaling intermediate of caspase-3 activation; E) Caspase-3 protein levels; F) Caspase-3 activity measured by fluorimetric assay. Data represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n=4-10). Different from control group: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. Different from ethanol-treated animals: #p<0.05; ##p<0.01.

187x209mm (300 x 300 DPI)





## *ARTÍCULO 2*

En este segundo estudio compararemos la eficacia del pretratamiento con OEA con otra aciletanolamida, la PEA, en la regulación de la expresión de citoquinas y enzimas pro-inflamatorias y la activación de NF- $\kappa$ B en la corteza frontal tras la inyección sistémica de LPS. También trataremos de comprobar el efecto de ambas aciletanolamidas en el estrés oxidativo y nitrosativo y en la peroxidación lipídica activadas tras la administración de LPS. Por último, observaremos el efecto del pretratamiento con OEA y con PEA en la regulación de las respuestas de fase aguda fisiológicas (activación del eje HPA, marcadores hipotalámicos de actividad pirógena endógena y termorregulación) y comportamentales (anhedonia) alteradas tras la administración aguda de LPS.



## RESEARCH ARTICLE

# Systemic Administration of Oleoylethanolamide Protects from Neuroinflammation and Anhedonia Induced by LPS in Rats

Aline Sayd, MSc; María Antón, MSc; Francisco Alén, PhD; Javier Rubén Caso, PhD; Javier Pavón, PhD; Juan Carlos Leza, MD, PhD; Fernando Rodríguez de Fonseca, MD, PhD; Borja García-Bueno, PhD; Laura Orio PhD

Department of Psychobiology, Faculty of Psychology, Complutense University, Complutense University of Madrid (UCM), Madrid, Spain (Ms Antón, and Drs Alén, Rodríguez de Fonseca and Orio); Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, UCM, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Madrid, Spain (Ms Sayd, and Drs Leza and García-Bueno); Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, UCM, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Madrid, Spain (Dr Caso); UGC Salud Mental, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Hospital Regional Universitario de Málaga-Universidad de Málaga, and Red de Trastornos Adictivos, Málaga, Spain (Drs Pavón and Rodríguez de Fonseca).

A.S., M.A., B.G.-B., and L.O. contributed equally to this work.

Correspondence: Laura Orio, PhD, Department of Psychobiology, Faculty of Psychology, Complutense University of Madrid, Campus de Somosaguas s/n, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid (email: [lorio@psi.ucm.es](mailto:lorio@psi.ucm.es)); and Borja García-Bueno, PhD, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria, 28480 Madrid, Spain ([bgbueno@med.ucm.es](mailto:bgbueno@med.ucm.es)).

## Abstract

**Background:** The acylethanolamides oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide are endogenous lipid mediators with proposed neuroprotectant properties in central nervous system (CNS) pathologies. The precise mechanisms remain partly unknown, but growing evidence suggests an antiinflammatory/antioxidant profile.

**Methods:** We tested whether oleoylethanolamide/palmitoylethanolamide (10 mg/kg, i.p.) attenuate neuroinflammation and acute phase responses (hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) stress axis stress axis activation, thermoregulation, and anhedonia) induced by lipopolysaccharide (0.5 mg/kg, i.p.) in rats.

**Results:** Lipopolysaccharide increased mRNA levels of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6, nuclear transcription factor- $\kappa$ B activity, and the expression of its inhibitory protein I $\kappa$ B $\alpha$  in cytoplasm, the inducible isoforms of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2, microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase mRNA, and proinflammatory prostaglandin E<sub>2</sub> content in frontal cortex 150 minutes after administration. As a result, the markers of nitrosative/oxidative stress nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and malondialdehyde were increased. Pretreatment with oleoylethanolamide/palmitoylethanolamide reduced plasma tumor necrosis factor- $\alpha$  levels after lipopolysaccharide, but only oleoylethanolamide significantly reduced brain tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA. Oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide prevented lipopolysaccharide-induced nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/I $\kappa$ B $\alpha$  upregulation in nuclear and cytosolic extracts, respectively, the expression of inducible isoforms of nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase and the levels of prostaglandin E<sub>2</sub>. Additionally, both acylethanolamides reduced lipopolysaccharide-induced

Received: September 16, 2014; Revised: December 5, 2014; Accepted: December 15, 2014

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of CINP.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

oxidative/nitrosative stress. Neither oleoylethanolamide nor palmitoylethanolamide modified plasma corticosterone levels after lipopolysaccharide, but both acylethanolamides reduced the expression of hypothalamic markers of thermoregulation interleukin-1 $\beta$ , cyclooxygenase-2, and prostaglandin E $_2$ , and potentiated the hypothermic response after lipopolysaccharide. Interestingly, only oleoylethanolamide disrupted lipopolysaccharide-induced anhedonia in a saccharine preference test.

**Conclusions:** Results indicate that oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide have antiinflammatory/neuroprotective properties and suggest a role for these acylethanolamides as modulators of CNS pathologies with a neuroinflammatory component.

**Keywords:** OEA, PEA, lipopolysaccharide, neuroinflammation, anhedonia

## Introduction

Endogenous lipid transmitters derived from membrane precursors are a current focus of investigation due to the wide range of biological functions in which they participate, including modulation of neurotransmitter release, neuroplasticity, synaptogenesis, neurogenesis, brain information processing, and cellular energetic systems (Orío et al., 2013). Fatty acid acylethanolamides are endogenous lipid mediators with multiple physiological functions that include the endocannabinoid anandamide (arachidonylethanolamide [AEA]) and the noncannabinimimetic compounds N-oleoylethanolamide (OEA) and N-palmitoylethanolamide (PEA). Though involved in different functions, the acylethanolamides share biosynthetic and degradative mechanisms. They are synthesized on demand through a phospholipase D enzyme acting on a membrane phospholipid precursor, which is synthesized by a cAMP and Ca $^{2+}$ -dependent N-acyltransferase (Piomelli, 2003). Upon its release, they experience reuptake by a catalytically silent fatty acid amide hydrolase (FAAH)-1 variant (Fu et al., 2011) and are degraded through enzymatic hydrolysis by a specific FAAH (Schmid et al., 1985; Cravatt et al., 1996).

OEA and PEA are structurally related compounds that act mainly through the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) (Rodríguez de Fonseca et al., 2001; Fu et al., 2003; Lo Verme et al., 2005; Di Cesare Mannelli et al., 2013), although they might bind the transient receptor potential vanilloid type-1 (Overton et al., 2006; Almasi et al., 2008; Godlewski et al., 2009), the G protein-coupled receptors GPR55 and GPR119 (Overton et al., 2006; Godlewski et al., 2009), or other PPAR isoforms (Paternity et al., 2013; but see Fu et al., 2003; LoVerme et al., 2006). OEA is known as a satiety factor (Rodríguez de Fonseca et al., 2001; Fu et al., 2003), and both PEA and OEA act as analgesics in inflammatory and neuropathic pain (Lo Verme et al., 2005; Suardiaz et al., 2007; Di Cesare Mannelli et al., 2013).

Growing evidence indicates that OEA and PEA may have neuroprotective properties in neurological disorders such as stroke (Sun et al., 2007; Zhou et al., 2012; Ahmad et al., 2012a), traumatic brain injury (Ahmad et al., 2012b), Parkinson's disease (Gonzalez-Aparicio et al., 2013; Gonzalez-Aparicio and Moratalla, 2013), or addiction (Melis et al., 2008; Plaza-Zabala et al., 2010; Bilbao et al., 2013; Coppola and Mondola, 2013). Some of the mechanisms implicated are the modulation of antioxidant responses, neuroinflammation, glial cell proliferation/differentiation, neurogenesis, and neurotransmission.

Given the significance and complexity of neuroinflammation in the physiopathology of central nervous system (CNS) diseases, we studied the role of OEA and PEA as modulators of the inflammatory/immune response after a lipopolysaccharide (LPS) challenge. LPS is a component of the outer membrane of gram-negative bacteria that is extensively used for neuroinflammation modeling. Systemic LPS injection to experimental animals elicits a multisystemic response that includes immune, endocrine, metabolic, and behavioral components known as

the acute-phase response and sickness behavior (Hart, 1988; Konsman et al., 2002; Kushner and Rzewnicki, 1997).

We tested the efficacy of OEA and PEA to modulate the canonical proinflammatory pathway triggered by the activation of the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Madrigal et al., 2001) after LPS and evaluated the acute-phase responses described as activation of hypothalamo-pituitary axis (HPA) (increases in plasma corticosterone), changes in hypothalamic markers of thermoregulation (interleukin [IL]-1 $\beta$ , cyclooxygenase [COX]-2, and prostaglandin [PG]E $_2$ ), and behavioral malaise (by checking motivational behavior).

## Methods

### Animals

Ninety-four male outbred Wistar Hannover rats (HsdRccHan:Wist, from Harlan, Spain), weighing 350 to 400 g, were housed in groups (n=5–6) and maintained at a constant temperature of 24 $\pm$ 2°C at a relative humidity of 70 $\pm$ 5% in a 12-hour light–dark cycle (lights on at 8:00 AM). Animals were fed a standard pellet chow (A04 SAFE, Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France) with free access to fresh tap water and were maintained under constant conditions for 10 days prior to experiments.

All experimental protocols were approved and followed the guidelines of the Animal Welfare Committee of the Universidad Complutense of Madrid according to European legislation (2010/63/UE).

### Drug Administration

LPS (serotype O111:B4, ref. L2630 Sigma, Spain) was dissolved in saline and injected i.p. at 0.5 mg/kg. The dose was chosen according to previous reports to induce neuroinflammation (MacDowell et al., 2013). OEA (10 mg/kg, i.p.; synthesized in our laboratory; Giuffrida et al., 2000) and PEA (10 mg/kg, i.p.; Tocris, Spain) were dissolved in vehicle (5% Tween 80 in saline) and injected 10 minutes before LPS administration. The doses were chosen according to previous studies in rodents reporting anti-inflammatory/neuroprotective effects (Plaza-Zabala et al., 2010; Ahmad et al., 2012a, 2012b; Zhou et al., 2012).

### Tissue Samples and Plasma Collection

Brain tissue samples were taken 150 minutes after LPS injection using a lethal dose of sodium pentobarbital (300 mg/kg, i.p., Doletal, Spain). The timing of sacrifice after LPS was chosen on the basis of previous studies showing an NF- $\kappa$ B-dependent proinflammatory response in the frontal cortex of Wistar rats at this time point (Perez-Nievas et al., 2010; MacDowell et al., 2013). Brains were isolated from the skull and meninges and blood vessels were carefully discarded. The frontal cortex and hypothalamus were excised and frozen at -80°C until assayed. Blood was collected by

cardiac puncture using trisodium citrate (3.15% wt/vol) as anticoagulant. Plasma was obtained by blood centrifugation (2000 g) 15 minutes at 4°C and stored at -20°C until determinations.

Rat brain frontal cortex was chosen because of its high levels of proinflammatory/antiinflammatory mediators and its susceptibility to the neuroinflammatory process elicited by LPS (Garcia-Bueno et al., 2008) and because this brain area is an important neural substrate for the regulation of the HPA axis response to an immune/inflammatory challenge (Radley et al., 2006). Hypothalamus is the main brain area involved in thermoregulation and fever (Saper, 1998).

### Preparation of Nuclear and Cytosolic Extracts

A modified procedure based on the method of Schreiber and colleagues (Schreiber et al., 1989) was used. Briefly, brain frontal cortex and hypothalamus samples were homogenized in 300 µL buffer (10 mmol/L N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethanesulfonic acid (pH 7.9); 1 mmol/L ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 1 mmol/L ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L dithiothreitol, 0.5 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mg/mL aprotinin, 1 mg/mL leupeptin, 1 mg/mL N-ethylmaleimide, 5 mmol/L NaF, 1 mmol/L NaVO<sub>3</sub>, 0.5 mol/L sucrose, and 10 mmol/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>). After 15 minutes, 0.5 % Nonidet P-40 (Roche, Mannheim, Germany) was added.

The tubes were vortexed and nuclei were collected by centrifugation at 8000 g for 5 minutes. Supernatants were considered as the cytosolic fraction. The pellets were resuspended in 100 µL buffer supplemented with 20% glycerol and 0.4 mol/L KCl and shaken for 30 minutes at 4°C. Nuclear protein extracts were obtained by centrifugation at 13000 g for 5 minutes, and aliquots of the supernatant were stored at -80°C. All steps of the fractionation were carried out at 4°C.

### Western-Blot Analyses

To determine the expression levels of the enzymes inducible nitric oxide synthase (iNOS) and COX-2, brain frontal cortices and hypothalamus were homogenized by sonication in 400 µL of phosphate-buffered saline (pH=7) mixed with a protease inhibitor cocktail (Complete, Roche, Madrid, Spain) followed by centrifugation at 12000 g for 10 minutes at 4°C. After adjusting protein levels in the supernatants, homogenates were mixed with Laemmli sample buffer (Bio Rad, CA) and 10 µL (1 mg/mL) was loaded into an electrophoresis gel.

Membranes were blocked in 10 mM Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 and 5% skimmed milk/bovine serum albumin (BSA) and incubated with specific primary

antibodies: IκBα (rabbit polyclonal antibody against an epitope mapping at the C-terminus of IκBα of human origin; dilution 1:1000 in 5% skimmed milk in BSA, Santa Cruz Biotechnology, CA); iNOS (rabbit polyclonal antibody against a peptide mapping at the amino terminus of iNOS of human origin; dilution 1:1000 in TBS-Tween, Santa Cruz Biotechnology, CA); COX-2 (goat polyclonal antibody against a peptide mapping at the C-terminus of COX-2 of human origin; dilution 1:750 in 5% BSA in TBS-Tween, Santa Cruz Biotechnology, CA). After washing with Tween 20, the membranes were incubated with the respective horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 90 minutes at room temperature. Blots were imaged using an Odyssey Fc System (Li-COR Biosciences), quantified by densitometry (NIH ImageJ software), and expressed in arbitrary units of optical density. The housekeeping gene β-actin was used as loading control.

### Real Time-Polymerase Chain Reaction Analysis

Total cytoplasmic RNA was prepared from samples of frontal cortex or hypothalamus using TRIZOL reagent (Invitrogen, Grand Island, NY); aliquots were converted to complementary DNA using random hexamer primers. Quantitative changes in mRNA levels were estimated by real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) using the following cycling conditions: 35 cycles of denaturation at 95°C for 10 seconds, annealing at 58–61°C for 15 seconds depending on the specific set of primers, and extension at 72°C for 20 seconds. Reactions were carried out in the presence of SYBR green (1:10000 dilution, Molecular Probes, Eugene, OR) in a 20-µL reaction in a Rotor-Gene (Corbett Research, Mortlake, Australia). The primers used were to detect IL-1β, IL-6, TNF-α, NF-κB p65 subunit, IκBα, iNOS, COX-2, and m-PGES-1 (sequence details in Table 1). Relative mRNA concentrations were obtained by comparing the take-off point of the different samples using the software provided in the unit. It establishes an inverse correlation between the number of cycles before take-off and the concentration of mRNA, while assigning arbitrary units to the results. Tubulin and GAPDH primer levels were used to normalize data (results are shown using tubulin normalization).

### Plasma Cytokine Determination

IL-1β and TNF-α plasma levels were determined using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (RayBiotech). Plasma samples were 1:2 diluted and assayed following the manufacturer's guidelines. Quantification was performed using a standard curve of increasing cytokines' concentrations. The optical density was measured

**Table 1.** RT-PCR Primer Sequence Details

	Forward Primers (3'-5')	Reverse Primers (5'-3')
IL-1β	ACCTGCTAGTGTGTGATGTCCCA	AGGTGGAGAGCTTTTCAGCTCACAT
IL-6	AAGCTGAGCGACGAGTACAAGA	GTCAGCTCCAGCAGCTTGTG
TNF-α	CTGGCCAATGGCATGGATCTCAA	ATGAAATGGCAAATCGGCTGACGG
NFκB p65	CATGCGTTTCCGTTACAAGTGCGA	TGGGTGCGTCTTAGTGGTATCTGT
IκBα	TGGCCTTCTCAACTTCCAGAACA	TCAGGATCACAGCCAGCTTTCAGA
iNOS	GGACCACCTCTATCAGGAA	CCTCATGATAACGTTTCTGGC
COX-2	CTTCGGGAGCACAACAGAG	GCGGATGCCAGTGATAGAG
m-PGES-1	GGTGAAGCAAATGTTCCAGCTCA	TTTAGCGGTTGGTCAAAGCCCATC
Tubulin	CCCTCGCCATGGTAAATACAT	ACTGGATGGTACGCTTGGTCT
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

Abbreviations: COX, cyclooxygenase; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; m-PGES-1, microsomal prostaglandin E2 synthase; NF, nuclear factor; RT-PCR, real time-polymerase chain reaction; TNF, tumor necrosis factor.



using a microplate reader (Synergy 2; BioTek Instruments) set to 450nm. The sensitivities of the assays were <80 pg/mL for IL-1 $\beta$  and <25 pg/mL for TNF- $\alpha$ . Intra-assay and inter-assay coefficients of variation were <10% and 12%, respectively, for both kits.

### Nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) Levels

As the stable metabolites of the free radical nitric oxide (NO<sup>•</sup>), NO<sub>2</sub><sup>-</sup> were measured by using the Griess method (Green et al., 1982). In an acidic solution with 1% sulphanilamide and 0.1% N-(1-Naphthyl)ethylenediamine (NEDA), nitrites convert into a pink compound that is photometrically calculated at 540nm in a microplate reader (Synergy 2; BioTek).

### Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation was measured by a modification of the method of Das and Ratty (1987), whereby the thiobarbituric acid reacting substances, predominantly malondialdehyde (MDA), produced as a secondary product were quantified by use of the 2-thiobarbituric acid (TBA) color reaction. Brain tissue was homogenized in 10 volumes (wt/vol) of sodium phosphate buffer (pH 7.4). Assays contained tissue homogenate, trichloroacetic acid (40% wt/vol), HCl (5M), and TBA (2% wt/vol). Samples were heated for 15 minutes at 90°C and centrifuged at 12000 g for 10 minutes. The MDA-TBA adduct (pink chromogen) of the supernatant was measured spectrophotometrically (532nm) and the MDA concentration calculated by use of a standard curve prepared with MDA tetra-butylammonium salt. The results were expressed as nmol/mg protein.

### Plasma Corticosterone

Corticosterone was measured in plasma by using a commercially available kit by RIA Coat-a-Count (Siemens, Los Angeles, CA). A gamma counter (Wallac Wizard 1470, Perkin Elmer, Waltham, MA) was used to measure radioactivity of the samples. The time of blood extraction and plasma collection oscillated between 1:00 PM and 3:00 PM.

### NF- $\kappa$ B Transcription Factor Assay

NF- $\kappa$ B transcription factor activity was determined in nuclear extracts by using an enzyme-linked immunosorbent assay-based kit (Cayman Chemicals, Tallin, Estonia). Nuclear extracts were incubated with specific NF- $\kappa$ B p65 subunit response element probes, and p65 bound to its response element probe was detected using a specific antibody against this subunit. Horseradish peroxidase-labeled secondary antibody was added and the binding was detected by spectrophotometry. Measurement was performed according to the manufacturer's instructions. This assay is specific for p65 activation, and it does not cross-react with other NF- $\kappa$ B subunits, such as p50.

### PGE<sub>2</sub> Determination

PGE<sub>2</sub> levels were measured by commercially available enzyme immunoassay (PGE<sub>2</sub> EIA Kit-Monoclonal; Cayman Chemical, Tallin, Estonia). Samples were sonicated in 400mL homogenization buffer (0.1M phosphate buffer, pH=7.4, 1mM EDTA, and 10mM indomethacin), purified in 4 volumes ethanol for 5 minutes at 4°C, centrifuged at 3000 g for 10 minutes, and acidified with glacial extracted using SPE (C-18) acetic acid (pH=3.5). PGE<sub>2</sub>

was extracted using SPE (C-18) columns (Waters, MA) rinsed with methanol and water. After sample's application, columns were washed with water and hexane and PGE<sub>2</sub> was eluted with ethyl acetate. Samples were evaporated to dryness under nitrogen and resuspended in enzyme immunoassay buffer. PGE<sub>2</sub> levels were measured in a 96-well plate and read at 405nm following the manufacturer's instructions (Synergy 2; BioTek Instruments). The sensitivity of the assay for PGE<sub>2</sub> was 15 pg/mL; intra- and interassay coefficients of variation were 6.6% and 15.5%, respectively.

### Protein Assay

Protein levels were measured using the Bradford method (Bradford, 1976).

### Measurement of Rectal Temperature

Rectal temperature was measured by the use of a digital read-out thermocouple (BAT12 thermometer, Physitemp) with a resolution of 0.1°C accuracy of  $\pm 0.1^\circ\text{C}$  attached to a RET-2 Rodent Sensor, which was inserted 2.5cm into the rectum of the rat, the animal being lightly restrained by holding it in the hand of a trained individual to avoid stress-confounding factors. A steady readout was obtained within 10 seconds of probe insertion.

### Saccharine Preference Test

Rats fed ad libitum were housed individually and were offered a free choice between 2 bottles located in the cages in a random manner, one with a 0.1% saccharin solution and another with tap water, during the time of the experiment (30 hours). Separated groups of animals were used to test the thermic response and the preference for saccharine. The consumption of water and saccharin solution was recorded at specific time intervals after pharmacological treatments. The preference for saccharin was calculated as consumed saccharin solution/total fluid intake. No previous food or water deprivation was applied before the test.

### Statistical Analyses

Data in text and figures are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by 2-way ANOVA comparing 2 factors: inflammation (vehicle or LPS) and pretreatment (vehicle, OEA, PEA), followed by Bonferroni posthoc test when appropriate. Data on saccharine preference test, total fluid intake, and rectal temperatures were analyzed by 2-way repeated-measures ANOVA using treatment as a between-subjects factor and time as a repeated measure, followed by Bonferroni posthoc test. The behavioral experiments (rectal temperatures and saccharine preference test) and Western blots were performed independently for OEA and PEA, so the 2-way ANOVA were run accordingly (reported in results in this order: OEA and PEA). Additionally, in the behavioral experiments, we ran a 2-way ANOVA comparing the 2 factors (inflammation and pretreatment) at specific time points of the temporal curves: we chose 1 hour and 3 hours after LPS in the temperature curves, since the hypothalamic markers were studied at a time in between (2.5 hours); in the saccharine preference test, we chose the last time point of the test (30 hours), since it represents an accumulated measure over time. A P value  $\leq .05$  was considered statistically significant. Data were analyzed using GraphPad Prism version 5.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

## Results

### Effect of OEA and PEA on Proinflammatory Cytokines in Frontal Cortex

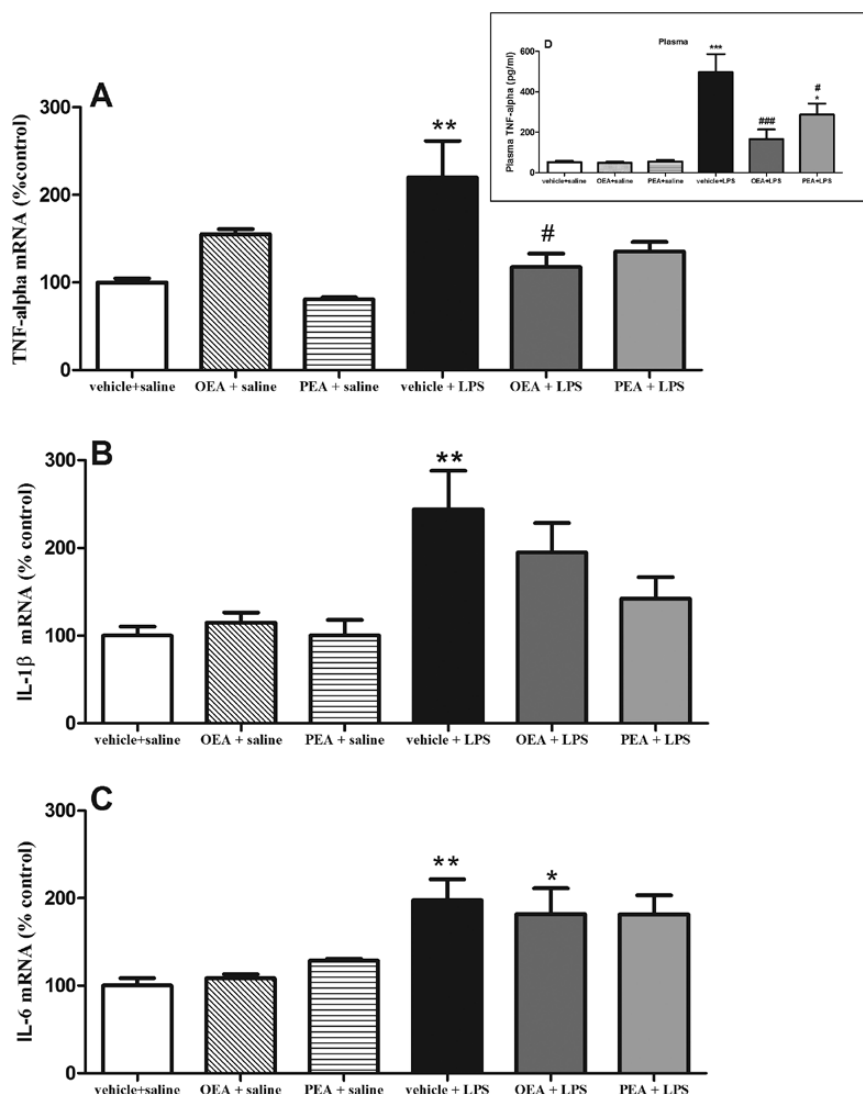
LPS administration increased mRNA expression of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  (Figure 1A;  $F_{(1,19)}P=5.97$ ,  $P=.0245$ ), IL-1 $\beta$  (Figure 1B;  $F_{(1,24)}P=10.34$ ,  $P=.0037$ ), and IL-6 (Figure 1C;  $F_{(1,19)}P=22.93$ ,  $P=.0001$ ) in frontal cortex 150 minutes after administration. Pretreatment with OEA significantly reduced the increase in TNF- $\alpha$  mRNA levels induced by LPS (interaction effect:  $F_{(2,19)}P=6.177$ ) and had no significant effect on IL-1 $\beta$  and IL-6 in the presence or absence of LPS. Although PEA reduces LPS-induced increase in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (but not IL-6) mRNA, posthoc test revealed that these effects failed to reach statistical significance.

To test whether the CNS effects of acylethanolamides may be affected by peripheral modulation of circulating cytokines, we measured TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in plasma after treatments. Figure 1D (graph box) shows that both OEA and PEA modified the increase

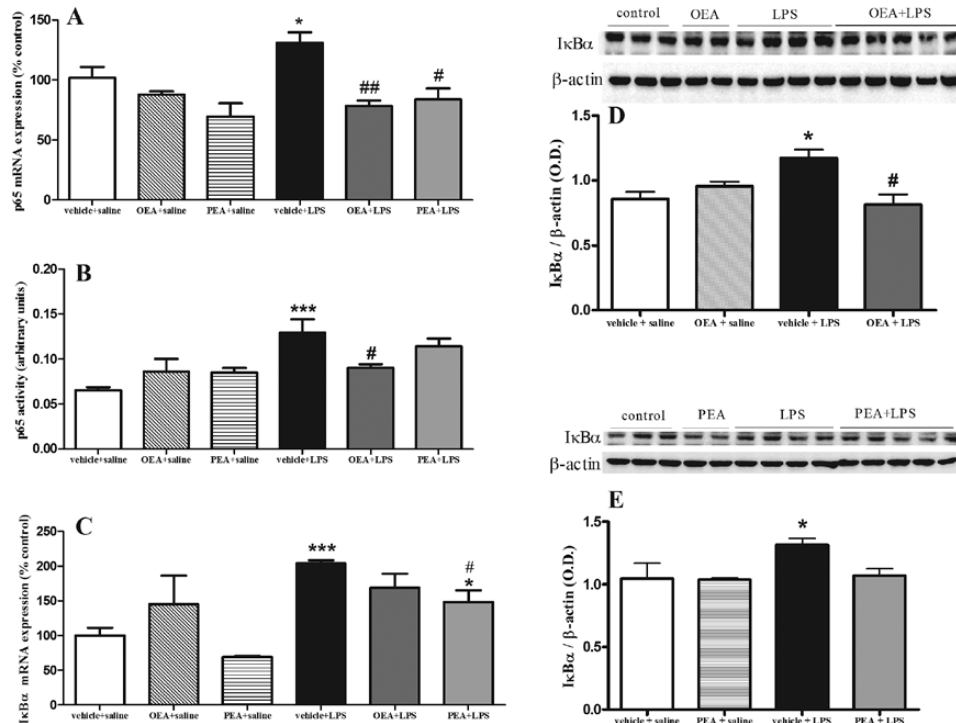
in plasma TNF- $\alpha$  observed after LPS injection (interaction effect  $F_{(2,67)}P=4.968$ ;  $P=.0097$ ). Levels of plasma IL-1 $\beta$  were not affected by the treatments (data not shown).

### Effect of OEA and PEA in the Activation of Proinflammatory NF- $\kappa$ B

The release of proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 after LPS may account for NF- $\kappa$ B activation, so we studied the mRNA expression and activity of NF- $\kappa$ B proinflammatory subunit p65 (Figure 2A-B) and its inhibitory protein I $\kappa$ B $\alpha$  (Figure 2C-E). LPS increased p65 subunit ( $F_{(1,18)}P=13.37$ ,  $P=.0011$ ) in nuclear extracts of frontal cortex, which is inhibited by OEA pretreatment at the level of mRNA (Figure 2A;  $F_{(2,16)}P=12.54$ ,  $P=.0009$ ) and activity (Figure 2B; interaction effect  $F_{(2,15)}P=5.313$ ,  $P=.0180$ ). PEA administration reduced the p65 mRNA expression (Figure 2A;  $F_{(2,15)}P=5.313$ ,  $P=.018$ ) but had no significant effect in the activity assay (Figure 2B;  $F_{(2,18)}P=.7028$ ,  $P=.5108$ ). LPS also induced an upregulation of I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA (Figure 2C;  $F_{(1,20)}P=25.60$ ,  $P<.0001$ ) and



**Figure 1.** Proinflammatory cytokines in frontal cortex (and plasma). Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (A), interleukin (IL)-1 $\beta$  (B), and IL-6 (C) mRNAs in frontal cortex 150 minutes after lipopolysaccharide (LPS) administration. Data ( $n=4-7$  per group) are normalized by tubulin and are presented as means  $\pm$  SEM. Data in D (graph box) represents plasma levels of TNF- $\alpha$  measured by ELISA. Different from control group: \* $P<.05$ , \*\* $P<.01$ ; different from vehicle + LPS rats: # $P<.05$  (2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test).



**Figure 2.** Nuclear factor (NF)- $\kappa$ B proinflammatory subunit p65 and its inhibitory protein I $\kappa$ B $\alpha$  in frontal cortex. A) Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of the proinflammatory p65 subunit of NF- $\kappa$ B in nuclear extracts. (B) Activity of NF- $\kappa$ B p65 subunit in nuclear extracts. (C) RT-PCR analysis of the NF- $\kappa$ B inhibitory protein I $\kappa$ B $\alpha$  in cytosolic extracts. (D) Western-blot and densitometric analysis of I $\kappa$ B $\alpha$  after oleoylethanolamide (OEA) pretreatment. (E) Western-blot and densitometric analysis of I $\kappa$ B $\alpha$  after palmitoylethanolamide (PEA) pretreatment. Data ( $n=3-5$ ) on RT-PCR and Western blot are normalized by tubulin and  $\beta$ -actin. Different from control group: \* $P < .05$ , \*\*\* $P < .001$ ; different from vehicle + lipopolysaccharide (LPS) rats: # $P < .05$ , ## $P < .01$  (2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test).

protein expression ( $F_{(1,13)} P=22.79$ ,  $P=.0008$ ) in cytosolic extracts that was prevented by PEA ( $F_{(2,20)} P=4.943$ ,  $P=.0187$ ) at the level of mRNA. Pretreatment with OEA reduced I $\kappa$ B $\alpha$  protein expression in LPS-treated animals (interaction effect ( $F_{(1,13)} P=39.48$ ,  $P < .0001$ ), whereas PEA had no significant effect at protein level.

### Proinflammatory Enzymes (COX-2 and iNOS): Effect of OEA and PEA

NF- $\kappa$ B regulates the expression of genes involved in the accumulation of oxidative/nitrosative and inflammatory mediators after LPS exposure. Among others, 2 main sources of these mediators dependent on NF- $\kappa$ B are iNOS and COX-2. LPS induced an increase in iNOS protein expression ( $F_{(1,13)} P=5.221$ ,  $P=.0482$ ) that was prevented by OEA (Figure 3A; interaction effect:  $F_{(1,13)} P=6.112$ ,  $P=.0354$ ) and by PEA (Figure 3B; interaction effect:  $F_{(1,13)} P=14.68$ ,  $P=.004$ ). Both acylethanolamides reduced iNOS mRNA expression in the LPS-treated condition (Figure 3C; interaction effect ( $F_{(2,20)} P=10.44$ ,  $P=.0013$ ). Similarly, LPS-induced COX-2 upregulation ( $F_{(1,10)} P=13.97$ ,  $P=.0057$ ) was blocked by the respective preadministration of OEA and PEA (Figure 3D-E, interaction effects:  $F_{(1,10)} P=61.66$ ,  $P < .0001$  and  $F_{(1,11)} P=9.388$ ,  $P=.0135$ ). COX-2 mRNA levels remain unchanged in all treatments at this time point (data not shown).

### Brain COX-2 and iNOS Main Products: PGE<sub>2</sub> Synthesis and NO<sub>2</sub> Accumulation. Effect of OEA and PEA

The presumed major iNOS and COX-2 brain products, NO and PGE<sub>2</sub>, respectively, are potent oxidant/proinflammatory molecules that have been directly related to cellular damage/death in multiple CNS pathologies.

PGE<sub>2</sub> is synthesized by a multienzymatic pathway in which the specific enzyme microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase

(mPGES-1) is the last step (Ivanov and Romanovsky, 2004). LPS increased mPGES-1 mRNA (Figure 4A;  $F_{(1,20)} P=70.19$ ,  $P < .0001$ ) and PGE<sub>2</sub> production (Figure 4B;  $F_{(1,22)} P=9.574$ ,  $P=.063$ ) in cortical tissue. As can be observed in Figure 4A-B, both OEA and PEA prevented the LPS-induced upregulation of mPGES-1 and PGE<sub>2</sub> (interaction effects:  $F_{(2,20)} P=13.20$ ,  $P=.0004$  and ( $F_{(2,20)} P=3.074$ ,  $P=.0711$ ).

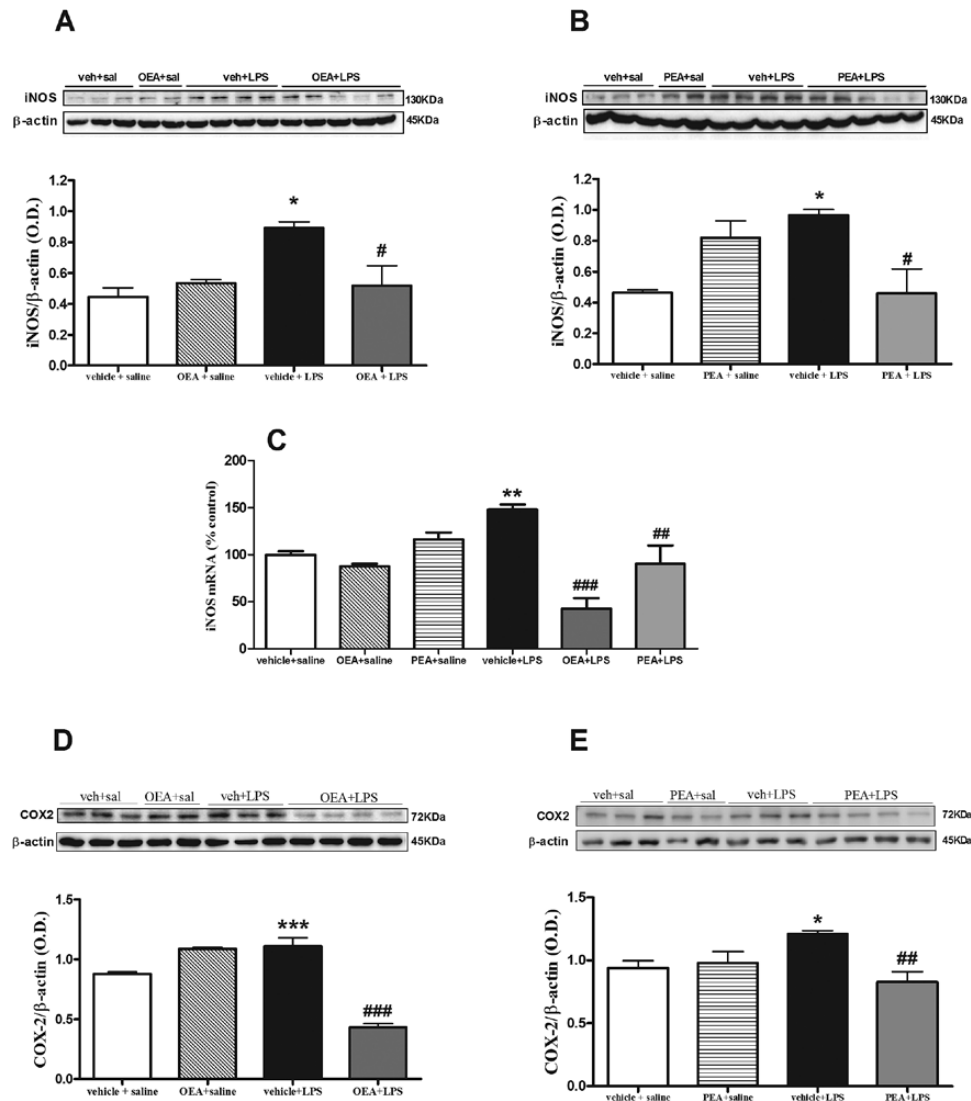
Figure 4C shows the accumulation of the main NO metabolite, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, after LPS ( $F_{(1,19)} P=5.692$ ,  $P=.0276$ ) that was prevented by pretreatment with both OEA and PEA (main effect of pretreatment ( $F_{(2,19)} P=6.203$ ,  $P=.0084$ ; interaction  $F_{(2,19)} P=.4733$ ,  $P=.63$ ).

### Lipid Peroxidation: Effect of OEA and PEA

As a marker of cellular damage elicited by oxidative/nitrosative stress, lipid peroxidation was assessed by measuring MDA accumulation. Figure 4D shows that OEA and PEA pretreatments prevented the LPS-induced overaccumulation of MDA in frontal cortex (effect of pretreatment  $F_{(2,19)} P=10.57$ ,  $P=.0008$  and interaction  $F_{(2,19)} P=4.009$ ,  $P=.0353$ ).

### Effects of OEA and PEA on Plasma Corticosterone Levels

The quantification of plasma corticosterone levels at the time of blood extraction (1:00-3:00 PM) revealed an expected corticosterone increase in LPS-injected animals ( $F_{(1,24)} P=18.29$ ,  $P=.0003$ ). The LPS-induced increase in corticosterone levels rose in 42% over control values (control:  $244.10 \pm 13.8$  ng/mL). Interestingly, at that time point, neither OEA (51.3% over controls) nor PEA (57.57% over controls) prevented the increase in corticosterone induced by LPS, suggesting that the mechanism of these compounds modulating neuroinflammation is independent of systemic corticosterone levels (Table 2).



**Figure 3.** Effect of acylethanolamides in lipopolysaccharide (LPS)-induced inducible isoforms of nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 expression. (A) Western-blot and densitometric analysis of iNOS after oleoethanolamide (OEA) pretreatment. (B) Western-blot and densitometric analysis of iNOS after palmitoylethanolamide pretreatment. (C) Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of iNOS after OEA and PEA pretreatments. (D) Western-blot and densitometric analysis of COX-2 after OEA pretreatment. (E) Western-blot and densitometric analysis of COX-2 after PEA pretreatment. Data (n=3-5) are represented as means  $\pm$  SEM. Different from control group: \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ ; different from vehicle + lipopolysaccharide (LPS): # $P < .05$ , ## $P < .01$ , ### $P < .001$  (2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test).

### Hypothalamic Markers of Thermoregulation: Effects of OEA and PEA

As another acute-phase response after LPS administration, we studied the expression of molecular markers related with temperature regulation in the hypothalamus.

The pyrogenic and proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  increased its mRNA up to 6 times in hypothalamus after LPS administration ( $F_{(1, 26)} = 14.62$ ,  $P = .0007$ ), and this increase was blocked by OEA and PEA pretreatments (Figure 5A; interaction effect:  $F_{(2, 26)} = 4.982$ ,  $P = .0147$ ). Similarly, LPS induced an upregulation of COX-2 mRNA in hypothalamus (Figure 5B;  $F_{(1, 25)} = 12.60$ ,  $P = .0016$ ) that was prevented by OEA and PEA (interaction effect:  $F_{(2, 25)} = 8.285$ ,  $P = .0017$ ).

PGE<sub>2</sub>, one of the major COX-2 products, is presumably a mediator of temperature deregulation after LPS (Ivanov and Romanovsky, 2004). As represented in Figure 5C-D, OEA and PEA prevented the mRNA upregulation of its synthesis enzyme

mPGES-1 (interaction effect:  $F_{(2, 28)} = 5.950$ ,  $P = .0070$ ) and the PGE<sub>2</sub> accumulation (interaction:  $F_{(2, 20)} = 6.132$ ,  $P = .0113$ ) induced by LPS in hypothalamus, suggesting an involvement of both acylethanolamides in the acute-phase responses of LPS related with body temperature regulation.

### Thermic Response

Figure 5E and F show the temperature deregulation after LPS injection. Three basal temperatures were recorded every 30 minutes before LPS administration. The media of the 2 first basal temperatures ( $t = -1.0$  hour and  $-0.5$  hour) was represented as "B" in the figures. Arrow indicates time of LPS injection. Basal temperatures immediately before LPS injection ( $t = 0$ ) did not differ significantly between groups of treatments ( $F_{(3, 23)} = .58$ ,  $P = .65$ , n.s., and  $F_{(3, 20)} = 1.15$ ,  $P = .037$ , n.s., for OEA (Figure 5E) and PEA (Figure 5F) experiments, respectively). Analysis of the temperature temporal curves by repeated measures 2-way



ANOVA showed interactions between time and treatment ( $F_{(15,95)} P=6.696, P < .0001$  and  $F_{(15,60)} P=14.60, P < .0001$ ) and main effects of time ( $F_{(5,95)} P=19.0, P < .0001$  and  $F_{(15,60)} P=27.12, P < .0001$ ) and treatment ( $F_{(3,95)} P=4.91, P=.0108$  and  $F_{(3,60)} P=51.35, P < .0001$ ). Additional analyses revealed that LPS induced a hypothermic response immediately after the injection and up to 3 to 6 hours posttreatment. Two-way ANOVA at specific time points revealed that pretreatments with OEA and PEA potentiated the hypothermic response 60 minutes after LPS ( $F_{(1,20)} P=40.25, P < .0001$  and ( $F_{(1,12)} P=33.31, P < .0001$ ) (Figure 5E-F).

### Saccharine Preference Test

The saccharine preference test was used to evaluate motivational behavior. A decrease in the preference for a natural reward (sucrose or saccharine) is reflective of anhedonia, which is a core symptom of a depressive-like state (Willner et al., 1987) and considered part of the sickness behavior after LPS administration (Yirmiya, 1996).

Repeated-measures 2-way ANOVA (Figure 6A and B, respectively) found an overall interaction between time and

treatments ( $F_{(15,100)} P=3.625, P < .0001$  and  $F_{(15,220)} P=5.011, P < .0001$ ) and main effects of time ( $F_{(5,100)} P=9.904, P < .0001$  and  $F_{(5,220)} P=3.83, P=.0024$ ) and treatment ( $F_{(3,100)} P=7.443, P=.0077$  and  $F_{(3,220)} P=19.17, P < .0001$ ). Subsequent analyses revealed that, as reflected in Figure 6, LPS injection induced a gradual decrease in the preference for a saccharine solution (from 3–8 hours up to 30 hours postadministration). Pretreatment with OEA (Figure 6A) to LPS-injected rats restored the preference for saccharine to the level of controls at any time point, whereas PEA pretreatment (Figure 6B) had no effect in this motivational test. The comparison between the factors inflammation and pretreatment by 2-way ANOVA at the time point of 30 hours posttreatment (see statistical methods) revealed a main effect of OEA pretreatment in LPS conditions ( $F_{(1,20)} P=25.92, P < .0001$ ) and no effect of PEA in the same condition ( $F_{(1,44)} P=.012, P=.92, n.s.$ ).

The total amount of liquid (water + saccharine solution) drunk by the animals in this test differs significantly between control and LPS-treated animals. OEA or PEA did not modify this LPS-induced effect (Table 3).

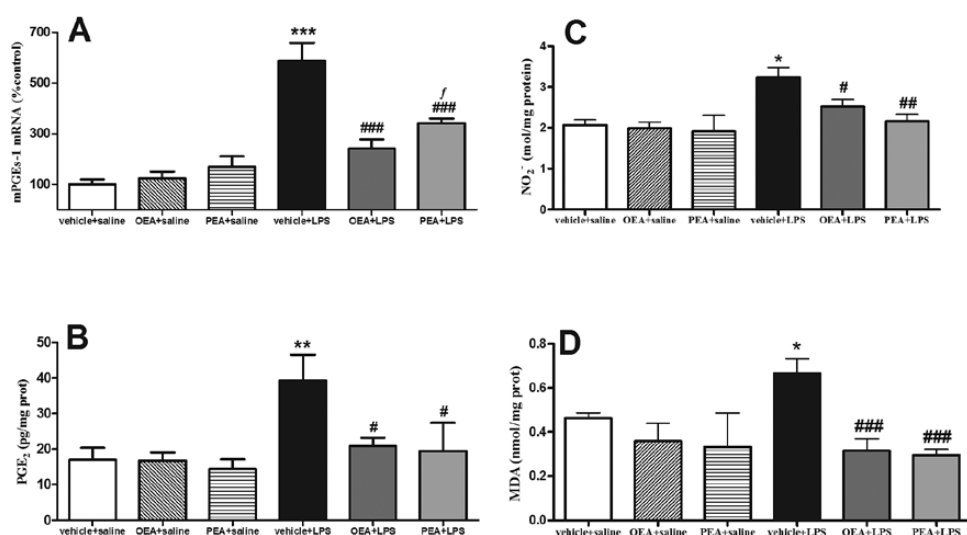
### Discussion

Recent studies have demonstrated that PEA and OEA endogenous levels are regulated in several CNS pathologies (Baker et al., 2001; Hansen et al., 2001; Schabitz et al., 2002; Berger et al., 2004; Degn et al., 2007; Bisogno et al., 2008; Hill et al., 2009; Hauer et al., 2013) and in acute inflammatory conditions induced by LPS (Balvers et al., 2012). Because of the proposed homeostatic protective role for both bioactive lipids, this acute response could be considered as part of an antiinflammatory protective homeostatic response regulating cell survival and damage (Fidaleo et al., 2014). Herewith, to further investigate the role of both acylethanolamides as a possible homeostatic mechanism in the brain, we decided to explore whether their exogenous administration might serve as a new neuroprotective pharmacologic manoeuvre.

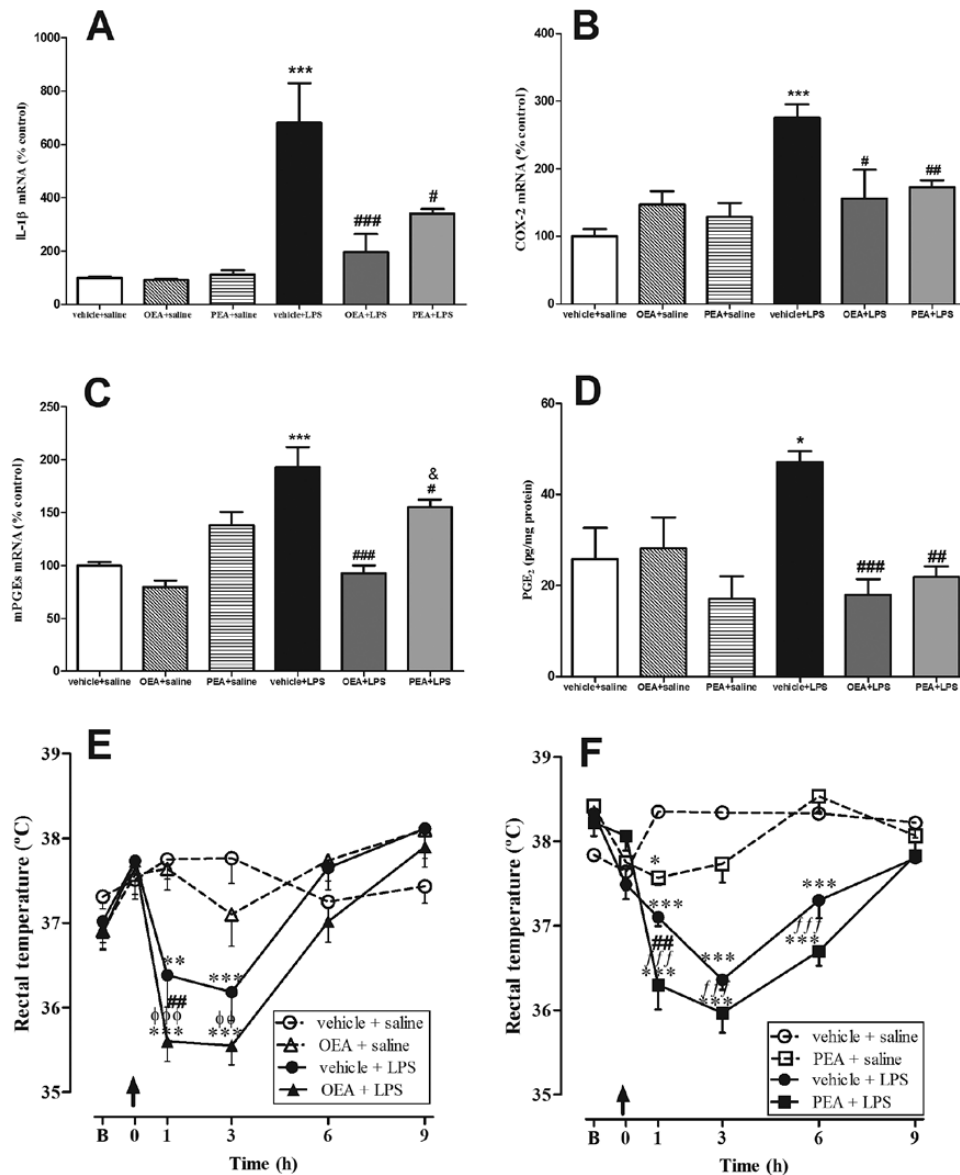
Our study provides new evidence of the brain antiinflammatory properties of OEA and PEA in a model of neuroinflammation in vivo. Our previous data indicate that OEA crosses the

**Table 2.** Plasma Corticosterone Levels. The values of corticosterone obtained in basal conditions ( $244.10 \pm 13.8$  ng/mL) were in accordance with the kit manufacturer's expected values in adult male Wistar rats. Lipopolysaccharide (LPS) increased plasma levels of corticosterone compared with control animals. Pretreatment with oleoylethanolamide (OEA) or palmitoylethanolamide (PEA) did not modify the LPS-induced increase in corticosterone. The time of blood extraction oscillated between 1:00 and 3:00 PM. Data are presented as means  $\pm$  SEM with  $n=5$  for each group of treatment.

Treatment	Corticosterone (ng/mL)
Vehicle + saline	$244.10 \pm 13.80$
OEA + saline	$259.17 \pm 32.94$
PEA + saline	$272.96 \pm 25.72$
Vehicle + LPS	$346.64 \pm 11.39$
OEA + LPS	$369.34 \pm 35.22$
PEA + LPS	$384.64 \pm 28.50$



**Figure 4.** Prostaglandin (PGE)<sub>2</sub> synthesis and release, nitrite accumulation, and lipid peroxidation in frontal cortex. (A) Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of the PGE<sub>2</sub> synthesis enzyme microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase (mPGE<sub>2</sub>-1). (B) PGE<sub>2</sub> levels measured by enzyme immunoassay. (C) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> accumulation. (D) Malondialdehyde accumulation as marker of lipid peroxidation. Data ( $n=3-6$ ) are represented as means  $\pm$  SEM. Different from control group: \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ ; different from vehicle + lipopolysaccharide (LPS): \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ ; different from palmitoylethanolamide (PEA) + saline: / $P < .05$  (2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test).

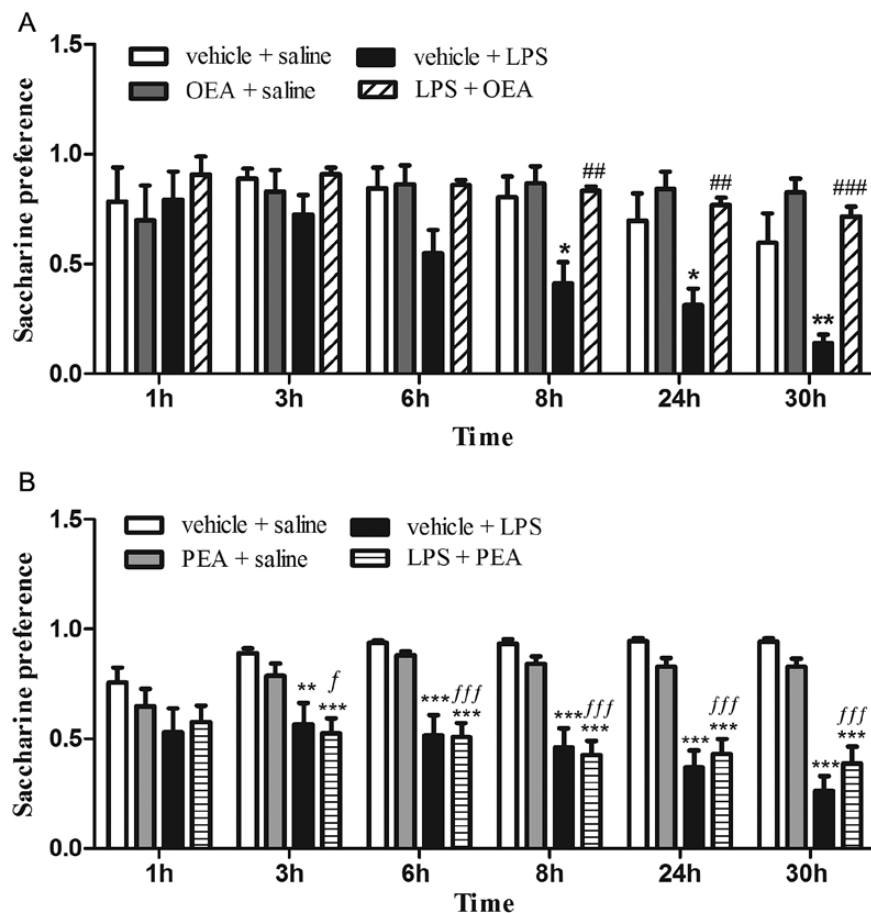


**Figure 5.** Thermoregulation and its hypothalamic markers. Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of interleukin (IL)-1 $\beta$  (A), cyclooxygenase (COX)-2 (B), and microsomal prostaglandin  $E_2$  synthase (mPGES-1) (C), and protein levels of prostaglandin (PG) $E_2$  (D) in the hypothalamus. Rectal temperatures of rats pretreated with oleoylethanolamide (OEA) (E) and palmitoylethanolamide (PEA) (F). Biochemical data are means  $\pm$  SEM (n=3-5). Rectal temperature data for OEA (E) and PEA (F) are represented as means  $\pm$  SEM (n=5-6). Arrows in temperature graphs indicate time of lipopolysaccharide (LPS) injection, "B" represents the mean of 2 first basal measures previous to LPS injection, and t=0 represents the third basal measure right before treatment administration. Different from control group: \*P < .05, \*\*P < .01, \*\*\*P < .001; different from vehicle + LPS: #P < .05, ##P < .01, ###P < .001; different from OEA + saline group: °P < .01, °°P < .05, °°°P < .001; different from PEA + saline: †P < .01, ††P < .05, †††P < .001 (biochemical data: 2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test; behavioral data: repeated-measures 2-way ANOVA with Bonferroni posthoc test).

blood-brain barrier and reaches the brain rapidly after i.p. administration. Specifically, peripheral administration of OEA (20mg/kg, i.p.) induced an increase in the OEA dialysate concentration in the dorsal striatum 20 minutes after injection (Gonzalez-Aparicio et al., 2014). Other authors detected a sustained 2-fold increase in OEA striatal levels over baseline for more than 2 hours after a single i.p. administration of OEA (20mg/kg), reaching the maximum peak concentration around 15 minutes postinjection (Plaza-Zabala et al., 2010). In both studies, the OEA concentration is within the range reported to produce stimulation of PPAR- $\alpha$  receptor-dependent transcription (120nM) (Fu et al., 2003). PEA has been reported to cross modestly the blood brain barrier after an oral dose (Artamonov et al., 2005). Nevertheless, in the present study we observed that OEA and PEA prevented the LPS-induced increase

in plasma TNF- $\alpha$  levels. These results, together with the studies mentioned above, indicate that the antiinflammatory effects of OEA and PEA observed in the brain may be a consequence of the modulation of peripheral inflammation (ie, modulation of innate immune TLR4 receptors) by these acylethanolamides and/or the direct action in the CNS. Disregarding the mechanisms involved, the brain is deeply affected by OEA and PEA pretreatments.

Here, we observed that OEA prevented LPS-induced increase in cortical TNF- $\alpha$  mRNA levels and both acylethanolamides reduced NF- $\kappa$ B activation, the expression of iNOS and COX-2, accumulation of NO $_2^-$ , and lipid peroxidation in frontal cortex. We supply further confirmation of this antiinflammatory mechanism by showing OEA and PEA reductions in LPS-induced increases in mPGES-1 and PGE $_2$  levels.



**Figure 6.** Saccharine preference test. (A) Rats pretreated with oleoylethanolamide (OEA). (B) Rats pretreated with palmitoylethanolamide (PEA). Saccharine preference was calculated as quantity of saccharine solution drunk/total fluid intake and is an index of the motivational state of the animal. The gradual decrease in the preference for a saccharine solution observed in LPS-injected rats reflects an anhedonic state, which is totally prevented by pretreatment with OEA (A) but not by PEA (B). Data ( $n=6-12$ ) are means  $\pm$  SEM. Repeated-measures 2-way ANOVA with Bonferroni posthoc test: different from control: \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ ; different from vehicle + lipopolysaccharide (LPS): \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ ; different from PEA+saline group:  $^{\circ}P < .05$ ,  $^{\circ\circ}P < .01$ ,  $^{\circ\circ\circ}P < .001$ ; different from PEA + saline group:  $^fP < .05$ ,  $^{ff}P < .01$ ,  $^{fff}P < .001$ .

**Table 3.** Total Fluid Intake at Different Time Points in the Saccharine Preference Test (A) Pretreatment with oleoylethanolamide (OEA) in lipopolysaccharide (LPS) or vehicle-injected rats. (B) Pretreatment with palmitoylethanolamide (PEA) in LPS or vehicle-injected rats. Animals injected with LPS decreased the total fluid intake (water + saccharine solution) during the saccharine preference test (6–30 hours) independently of the pretreatment with OEA (9–30 hours) (A) or PEA (6–30 hours) (B). Data are means  $\pm$  SEM. Repeated-measures 2-way ANOVA with Bonferroni posthoc test for Table 3A and B, respectively: overall interactions between time and treatment ( $F_{(15,100)} P=8.399$ ,  $P < .0001$  and  $F_{(15,220)} P=31.14$ ,  $P < .0001$ ) and main effects of time ( $F_{(5,100)} P=48.88$ ,  $P < .0001$  and  $F_{(5,220)} P=135.0$ ,  $P < .0001$ ) and treatment ( $F_{(3,100)} P=8.503$ ,  $P=.0008$  and  $F_{(3,220)} P=32.40$ ,  $P < .0001$ ). Different from control group: \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ ; different from OEA + saline group:  $^{\circ}P < .05$ ,  $^{\circ\circ}P < .01$ ,  $^{\circ\circ\circ}P < .001$ ; different from PEA + saline group:  $^fP < .05$ ,  $^{ff}P < .01$ ,  $^{fff}P < .001$ .

Total Fluid Intake						
<b>A</b>						
Treatment/time	1 h	3 h	6 h	9 h	24 h	30 h
Vehicle + saline	5.08 $\pm$ 1.30	14.47 $\pm$ 3.55	22.33 $\pm$ 6.30	27.77 $\pm$ 8.20	34.02 $\pm$ 8.80	48.42 $\pm$ 12.30
OEA + saline	1.34 $\pm$ 0.55	15.2 $\pm$ 3.58	26.68 $\pm$ 5.29	33.45 $\pm$ 6.79	45.82 $\pm$ 9.66	57.12 $\pm$ 10.21
Vehicle + LPS	0.95 $\pm$ 0.53	1.27 $\pm$ 0.51	2.46 $\pm$ 0.75*	3.82 $\pm$ 0.78**	7.58 $\pm$ 2.29**	14.883 $\pm$ 1.94***
OEA + LPS	3.23 $\pm$ 1.12	4.35 $\pm$ 1.14	4.98 $\pm$ 1.18 $^{\circ}$	5.58 $\pm$ 1.29 $^{\circ\circ}$	6.90 $\pm$ 1.69 $^{\circ\circ\circ}$	8.35 $\pm$ 2.02 $^{\circ\circ\circ}$
<b>B</b>						
Treatment/time	1 h	3 h	6 h	9 h	24 h	30 h
Vehicle + saline	8.68 $\pm$ 1.75	19.10 $\pm$ 3.04	40.71 $\pm$ 4.51	63.86 $\pm$ 6.12	87.65 $\pm$ 8.98	109.70 $\pm$ 11.08
PEA + saline	7.69 $\pm$ 3.58	14.96 $\pm$ 4.12	33.82 $\pm$ 5.34	49.93 $\pm$ 7.84	62.80 $\pm$ 9.99	83.81 $\pm$ 12.69
Vehicle + LPS	2.58 $\pm$ 0.67	2.83 $\pm$ 0.65	3.31 $\pm$ 0.71***	4.37 $\pm$ 0.95***	6.92 $\pm$ 1.79***	11.45 $\pm$ 2.98***
PEA + LPS	2.33 $\pm$ 0.61	4.37 $\pm$ 1.47	3.31 $\pm$ 0.74 $^{fff}$	4.26 $\pm$ 0.86 $^{fff}$	7.79 $\pm$ 1.74 $^{fff}$	15.24 $\pm$ 3.32 $^{fff}$

We also provide the first evidence to our knowledge supporting a differential role for OEA and PEA influencing the acute-phase responses after LPS. Thus, OEA and PEA did not modify

the increase in plasma corticosterone levels elicited by LPS. In the hypothalamus, OEA and PEA potentially altered the expression of IL-1 $\beta$ , COX-2, and PGE $_2$ , which are presumably mediators of

body temperature regulation, and they enhanced the hypothermic response 60 minutes after LPS administration. Interestingly, at a behavioral level, only OEA affected the motivational state of the animals by inhibition of LPS-induced anhedonia, demonstrating that OEA might exert important roles in controlling motivational processes (hedonic responses) as described for fat-containing food (Rodríguez de Fonseca et al., 2001; Tellez et al., 2013).

These selective effects of both acylethanolamides on LPS-induced acute-phase responses might reflect differential mechanisms of action that need to be further explored. OEA/PEA binding to PPAR- $\alpha$  receptor may mediate these effects (Fidaleo et al., 2014), but PPAR- $\alpha$  independent actions of these acylethanolamides cannot be ruled out.

The antiinflammatory profile of both acylethanolamides has been previously described in vitro, where OEA was shown to reduce iNOS, COX-2, and the cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 in blood vessels after LPS-induced LDL modification and inflammation (Fan et al., 2014) and in animal models of inflammatory and neuropathic pain (Lo Verme et al., 2005; Suardiaz et al., 2007; Di Cesare Mannelli et al., 2013).

OEA and PEA blocked the expression and/or activity of the p65 subunit in cortical nuclear extracts, which mediates most of the NF- $\kappa$ B transcriptional activity. LPS also increased the expression of the NF- $\kappa$ B inhibitory protein I $\kappa$ B $\alpha$  in cytosolic extracts, which can be considered an autoregulatory mechanism switched on by NF- $\kappa$ B to block its stimulation, and was similarly prevented by OEA and PEA pretreatments. Our results are in agreement with other studies where PEA and OEA prevented I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and p65 NF- $\kappa$ B nuclear translocation in peripheral hyperalgesia (D'Agostino et al., 2009) and stroke injury (Sun et al., 2007; Ahmad et al., 2012b).

Sickness behavior after LPS was evaluated by measurement of the following acute-phase responses: activation of HPA axis, body temperature regulation, and anhedonia. Activation of HPA axis was checked by measurement of plasma corticosterone levels. LPS induced an increase in plasma corticosterone that has been previously reported (Pérez-Nievas et al., 2010). However, neither OEA nor PEA prevented the rise in corticosterone induced by LPS. Our results are in agreement with a previous study in which the administration of URB597, a selective inhibitor of FAAH that enhances the levels of AEA, OEA, and PEA, did not alter an LPS-induced increase in plasma corticosterone (Kerr et al., 2012). However, the bidirectional relationship between endocannabinoids and plasma glucocorticoids released in the stress response is well documented (Gorzalka et al., 2008; Hill et al., 2010). It is necessary to develop more detailed neuroendocrine studies regarding the time course of synthesis and release of corticosterone and other stress hormones after LPS to completely discard a role of noncannabinoid acylethanolamines in the regulation of HPA axis activation.

Regarding temperature regulation, we observed a marked hypothermia induced by LPS immediately after its administration and lasting between 3 and 6 hours. Our results are in agreement with other studies reporting dose- and serotype-specific effects of LPS: high doses (0.25–0.5 mg/kg, i.p.) of E.coli O111:B4 induced a monophasic hypothermic response in rodents (Akarsu and Mamuk, 2007). It is important to note that, although fever is a most predicted response, hypothermia occurs in the most severe cases of sepsis (Clemmer et al., 1992; Arons et al., 1999). It has been suggested that the hypothermia in response to LPS is caused by reduced thermogenesis, involves antipyretic products released from peripheral macrophages, and is mediated by prostaglandins (Derijk RH et al., 1994). In our study, the onset of this hypothermic response caused by LPS is around the time of sacrifice of the animals (150 minutes). Biochemical determinations

revealed that, at this time point, LPS induced a marked increase in pyretic molecules, such as IL-1 $\beta$ , COX-2, and PGE<sub>2</sub> in the hypothalamus, probably as a homeostatic mechanism to recover normal temperature. Interestingly, OEA and PEA pretreatments potentiated the hypothermic response 60 minutes after LPS. Body temperature regulation is a highly preserved homeostatic response that is probably difficult to maintain altered by a single dose of these endogenous components. We observed robust effects of both acylethanolamides preventing the LPS-induced high increases in IL-1 $\beta$ , COX-2, mPGES-1 mRNAs, and PGE<sub>2</sub> levels, which strengthens our hypothesis of OEA and PEA attempting to maintain the hypothermia induced by LPS. Hypothermia can be understood as an adaptive response that enhances recovery by conserving energy to combat acute inflammation and enhance survival (Leon, 2004; Maes et al., 2012). Recently, another N-ethanolamide derived from fatty acids, commonly known as the endocannabinoid AEA, has been involved in the LPS-induced thermic response through action on CB1 receptors (Steiner et al., 2011), and a role for COX-1 and not COX-2 has been suggested for LPS-induced hypothermia (Steiner et al., 2009). Interestingly, peripheral and brain AEA levels are elevated during the systemic inflammatory response to LPS (Liu et al., 2003; Fernandez-Solari et al., 2006). However, Kerr and colleagues (2012) reported that LPS failed to alter AEA, OEA, and PEA levels in the hypothalamus.

The sickness behavior is also characterized by a behavioral inhibition, physio-somatic disturbances such as fatigue and malaise, and an inability to feel pleasure or anhedonia (Maes et al., 2012). In our study, the influence of OEA and PEA in motivational behavior was tested by checking anhedonia in a saccharine preference test. LPS-injected animals pretreated with OEA, but not PEA, showed a preference for the natural reward saccharine similar to control animals, which is interpreted as a disruption of LPS-induced anhedonia. Anhedonia is a prolonged effect of LPS that persists beyond the acute sickness response, and this behavioral change is thought to reflect a depressive-like phenotype (Willner et al., 1987). Modulation of LPS acute neuroinflammatory responses by OEA can therefore elicit long-lasting motivational behavioral effects and possibly antidepressant-like effects. Total amount of liquid (water plus saccharine solution) was, however, reduced in LPS-injected rats independently of any pretreatment. A decrease in total drinking could be indicative of behavioral inhibition or fatigue during LPS-induced sickness behavior. Despite the fact it is a satiety factor (Romano et al., 2014), OEA at a single dose did not modify the preference for fluids or the total drinking in control animals. However, interestingly, OEA affected the saccharine preference in LPS rats and modified the anhedonic state after LPS, inducing a positive motivational state similar to control animals. Elimination of motivational deficits by OEA could be linked with a role of this lipid mediator on the control of dopamine release in the reward system. This effect has been clearly demonstrated for high fat-containing foods (Tellez et al., 2013) or nicotine-mediated reward (Mascia et al., 2011; Buczynski et al., 2012). Alternatively, anhedonia has been directly related with lasting lipid peroxidation alterations in the prefrontal cortex in a chronic stress depression paradigm (Cline et al., 2014). In our study, OEA prevented both lipid peroxidation in frontal cortex and anhedonia after LPS. Further studies will be necessary to ascertain whether inhibition of LPS-induced lipid peroxidation by OEA is long lasting and may be related with the OEA antianhedonic effect.

The proposed neuroprotective effects of OEA and PEA may derive in part from their antiinflammatory and antioxidative functions, as well as their modulation of neuronal activity (Melis et al., 2013). Given the importance of neuroinflammation in the physiopathology of neuropsychiatric diseases, our results



suggest that OEA and PEA might help delay the onset of neurodegenerative and neuropsychiatric diseases by reducing the insults to brain functions. Finally, from a translational point of view, OEA might also have a beneficial profile as a therapeutic agent, since it may ameliorate the motivational state of individuals with neuroinflammatory or immune related neuropsychiatric conditions.

## Acknowledgments

This research was supported by The Spanish Ministry of Health and Social Policy (PNSD, PR29/11-18295 to L.O.), the Regional Government of Madrid (S2011/BMD-2308. CANNAB to J.C.L.), Universidad Complutense-Santander (2878-920140 to J.C.L.), and Consejería de Salud y Bienestar Social, Junta Andalucía (PI0228-2013). B.G.-B. is a Ramón y Cajal postdoctoral fellow (Spanish Ministry of Education and Science).

Interest Statement: None.

## References

- Ahmad A, Genovese T, Impellizzeri D, Crupi R, Velardi E, Marino A, Esposito E, Cuzzocrea S (2012a) Reduction of ischemic brain injury by administration of palmitoylethanolamide after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 1477:45–58.
- Ahmad A, Crupi R, Impellizzeri D, Campolo M, Marino A, Esposito E, Cuzzocrea S (2012b) Administration of palmitoylethanolamide (PEA) protects the neurovascular unit and reduces secondary injury after traumatic brain injury in mice. *Brain, behavior, and immunity* 26:1310–1321.
- Akarsu ES, Mamuk S (2007) *Escherichia coli* lipopolysaccharides produce serotype-specific hypothermic response in biotelemetered rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R1846–R1850.
- Almasi R, Szoke E, Bolcskei K, Varga A, Riedl Z, Sandor Z, Szolcsanyi J, Petho G (2008) Actions of 3-methyl-N-oleoyldopamine, 4-methyl-N-oleoyldopamine and N-oleoylethanolamide on the rat TRPV1 receptor in vitro and in vivo. *Life Sci* 82:644–651.
- Arons MM, Wheeler AP, Bernard GR, Christman BW, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, Fulkerson W, Wright P, Dupont WD, Swindell BB (1999) Effects of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. *Crit Care Med* 27:699–707.
- Artamonov M, Zhukov O, Shuba I, Storozhuk L, Khmel T, Klimashinsky V, Mikosha A, Gula N (2005) Incorporation of labelled N-acylethanolamine (NAE) into rat brain regions in vivo and adaptive properties of saturated NAE under x-ray irradiation. *Ukr Biokhim Zh* 77(6):51–62.
- Bachur NR, Masek K, Melmon KL, Udenfriend S (1965) Fatty acid amides of ethanolamine in mammalian tissues. *J Biol Chem* 240:1019–1024.
- Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, Khanolkar A, Layward L, Fezza F, Bisogno T, Di Marzo V (2001) Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J* 15:300–302.
- Balvers MG, Verhoeckx KC, Meijerink J, Bijlsma S, Rubingh CM, Wortelboer HM, Witkamp RF (2012) Time-dependent effect of in vivo inflammation on eicosanoid and endocannabinoid levels in plasma, liver, ileum and adipose tissue in C57BL/6 mice fed a fish-oil diet. *Int Immunopharmacol* 13:204–214.
- Berger C, Schmid PC, Schabitz WR, Wolf M, Schwab S, Schmid HH (2004) Massive accumulation of N-acylethanolamines after stroke. Cell signalling in acute cerebral ischemia? *J Neurochem* 88(5):1159–1167.
- Bilbao A, Blanco E, Luque-Rojas MJ, Suarez J, Palomino A, Vida M, Araos P, Bermudez-Silva FJ, Fernandez-Espejo E, Spanagel R, Rodriguez de Fonseca F (2013) Oleoylethanolamide dose-dependently attenuates cocaine-induced behaviours through a PPARalpha receptor-independent mechanism. *Addict Biol* 18:78–87.
- Bisogno T, Martire A, Petrosino S, Popoli P, Di Marzo V (2008) Symptom-related changes of endocannabinoid and palmitoylethanolamide levels in brain areas of R6/2 mice, a transgenic model of Huntington's disease. *Neurochem Int* 52:307–13.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Buczynski MW, Polis IY, Parsons LH (2013) The volitional nature of nicotine exposure alters anandamide and oleoylethanolamide levels in the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 38:574–84.
- Clemmer TP, Fisher CJ, Bone RC, Slotman GJ, Metz CA, Thomas FO (1992) Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. *Crit Care Med* 20:1395–1401.
- Cline BH, Anthony DC, Lysko A, Dolgov O, Anokhin K, Schroeter C, Malin D, Kubatiev A, Steinbusch HW, Lesch KP, Strekalova T (2014) Lasting downregulation of the lipid peroxidation enzymes in the prefrontal cortex of mice susceptible to stress-induced anhedonia. *Behav Brain Res pii:S0166-4328(14)00255-1. doi:10.1016/j.bbr.2014.04.037*.
- Coppola M, Mondola R (2013) Palmitoylethanolamide: from endogenous cannabimimetic substance to innovative medicine for the treatment of cannabis dependence. *Med Hypotheses* 81:619–622.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384:83–87.
- D'Agostino G, La Rana G, Russo R, Sasso O, Lacono A, Esposito E, Mattace Raso G, Cuzzocrea S, Loverme J, Piomelli D, Meli R, Calignano A (2009) Central administration of palmitoylethanolamide reduces hyperalgesia in mice via inhibition of NF-kappaB nuclear signaling in dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol* 613:54–9.
- Das NP, Ratty AK (1987) Studies on the effects of the narcotic alkaloids, cocaine, morphine, and codeine on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. *Biochem Med Metab Biol* 37:258–264.
- Degn M, Lambertsen KL, Petersen G, Meldgaard M, Artmann A, Clausen BH, Hansen SH, Finsen B, Hansen HS, Lund TM (2007) Changes in brain levels of N-acylethanolamines and 2-arachidonoylglycerol in focal cerebral ischemia in mice. *J Neurochem* 103:1907–1916.
- Derijk RH, Van Kampen M, Van Rooijen N, Berkenbosch F (1994) Hypothermia to endotoxin involves reduced thermogenesis, macrophage-dependent mechanisms, and prostaglandins. *Am J Physiol* 266:R1–8.
- Di Cesare Mannelli L, D'Agostino G, Pacini A, Russo R, Zannadelli M, Ghelardini C, Calignano A (2013) Palmitoylethanolamide is a disease-modifying agent in peripheral neuropathy: pain relief and neuroprotection share a PPAR-alpha-mediated mechanism. *Mediators Inflamm* 2013:328797.
- Fan A, Wu X, Wu H, Li L, Huang R, Zhu Y, Qiu Y, Fu J, Ren J, Zhu C (2014) Atheroprotective effect of oleoylethanolamide (OEA) targeting oxidized LDL. *PLoS One* 9:e85337.
- Fernandez-Solari J, Prestifilippo JP, Bornstein SR, McCann SM, Rettori V (2006) Participation of the endocannabinoid system

- in the effect of TNF- $\alpha$  on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone. *Ann N Y Acad Sci* 1088:238–250.
- Fidaleo M, Fanelli F, Ceru MP, Moreno S (2014) Neuroprotective properties of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) and its lipid ligands. *Curr Med Chem*. In press (PMID:24606520).
- Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D (2003) Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- $\alpha$ . *Nature* 425:90–93.
- Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, Guizarro A, Lodola A, Armirotti A, Garau G, Bandiera T, Reggiani A, Mor M, Cavalli A, Piomelli D (2011) A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci* 15:64–69.
- Galan-Rodriguez B, Suarez J, Gonzalez-Aparicio R, Bermudez-Silva FJ, Maldonado R, Robledo P, Rodriguez de Fonseca F, Fernandez-Espejo E (2009) Oleylethanolamide exerts partial and dose-dependent neuroprotection of substantia nigra dopamine neurons. *Neuropharmacology* 56(3):653–664.
- Garcia-Bueno B, Caso JR, Leza JC (2008) Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1136–1151.
- Giuffrida A, Rodriguez de Fonseca F, Piomelli D (2000) Quantification of bioactive acylethanolamides in rat plasma by electrospray mass spectrometry. *Anal Biochem* 280:87–93.
- Godlewski G, Offertaler L, Wagner JA, Kunos G (2009) Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 89:105–111.
- Gonzalez-Aparicio R, Blanco E, Serrano A, Pavon FJ, Parsons LH, Maldonado R, Robledo P, Fernandez-Espejo E, de Fonseca FR (2013) The systemic administration of oleylethanolamide exerts neuroprotection of the nigrostriatal system in experimental Parkinsonism. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:455–468.
- Gonzalez-Aparicio R, Moratalla R (2013) Oleylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinsons disease. *Neurobiol Dis* 62:416–425.
- Gorzalka BB, Hill MN, Hillard CJ (2008) Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1152–1160.
- Hansen HH, Ikonomidou C, Bittigau P, Hansen SH, Hansen HS (2001) Accumulation of the anandamide precursor and other N-acyl ethanolamine phospholipids in infant rat models of in vivo necrotic and apoptotic neuronal death. *J Neurochem* 76:39–46.
- Hart BL (1988) Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* 12:123–137.
- Hauer D, Schelling G, Gola H, Campolongo P, Morath J, Roozendaal B, Hamuni G, Karabatsiakakis A, Atsak P, Vogeser M, Kolassa IT (2013) Plasma concentrations of endocannabinoids and related primary fatty acid amides in patients with post-traumatic stress disorder. *PLoS One* 8:e62741.
- Hill MN, Miller GE, Carrier EJ, Gorzalka BB, Hillard CJ (2009) Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology* 34:1257–1262.
- Hill MN, Patel S, Campolongo P, Tasker JG, Wotjak CT, Bains JS (2010) Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. *J Neurosci* 30:14980–14986.
- Ivanov AI, Romanovsky AA (2004) Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci* 9:1977–1993.
- Kilaru A, Isaac G, Tamura P, Baxter D, Duncan SR, Venables BJ, Welti R, Koulou P, Chapman KD (2010) Lipid profiling reveals tissue-specific differences for ethanolamide lipids in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Lipids* 45:863–875.
- Kerr DM, Burke NN, Ford GK, Connor TJ, Harhen B, Egan LJ, Finn DP, Roche M (2012) Pharmacological inhibition of endocannabinoid degradation modulates the expression of inflammatory mediators in the hypothalamus following an immunological stressor. *Neuroscience* 204:53–63.
- Konsman JP, Parnet P, Dantzer R (2002) Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* 25:154–159.
- Kushner I, Rzewnicki, DL (1997) The acute phase response. In: Mackowiak PA. *Fever: basic mechanisms and management*. Lippincott-Raven: Philadelphia.
- Leon LR (2004) Hypothermia in systemic inflammation: role of cytokines. *Front Biosci* 9:1877–1888.
- Liu J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Wagner JA, Cravatt BF, Gao B, Kunos G (2003) Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF- $\kappa$ B independently of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 278:45034–45039.
- Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D (2005) The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  mediates the antiinflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol* 67:15–19.
- LoVerme J, Russo R, La Rana G, Fu J, Farthing J, Mattace-Raso G, Meli R, Hohmann A, Calignano A, Piomelli D (2006) Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *J Pharmacol Exp Ther* 319:1051–1061.
- MacDowell KS, Garcia-Bueno B, Madrigal JL, Parellada M, Arango C, Mico JA, Leza JC (2013) Risperidone normalizes increased inflammatory parameters and restores antiinflammatory pathways in a model of neuroinflammation. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:121–135.
- Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Bosca L, Leza JC (2001) Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor  $\kappa$ B-mediated mechanisms. *J Neurochem* 76:532–538.
- Maes M, Berk M, Goehler L, Song C, Anderson G, Galecki P, Leonard B (2012) Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC Medicine* 10:66.
- Mascia P, Pistis M, Justinova Z, Panlilio LV, Luchicchi A, Lecca S, Scherma M, Fratta W, Fadda P, Barnes C, Redhi GH, Yasar S, Le Foll B, Tanda G, Piomelli D, Goldberg SR (2011) Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of  $\alpha$ -type peroxisome proliferator-activated receptors. *Biol Psychiatry* 69:633–641.
- Melis M, Pillolla G, Luchicchi A, Muntoni AL, Yasar S, Goldberg SR, Pistis M (2008) Endogenous fatty acid ethanolamides suppress nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptors. *J Neurosci* 28:13985–13994.
- Melis M, Carta G, Pistis M, Banni S (2013) Physiological role of peroxisome proliferator-activated receptors type  $\alpha$  on dopamine systems. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12:70–77.
- Orio L, Pavon FJ, Blanco E, Serrano A, Araos P, Pedraz M, Rivera P, Calado M, Suarez J, de Fonseca FR (2013) Lipid transmitter signaling as a new target for treatment of cocaine addiction: new roles for acylethanolamides and lysophosphatidic acid. *Curr Pharm Des* 19:7036–7049.

- Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C (2006) Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab* 3:167–175.
- Paterniti I, Impellizzeri D, Crupi R, Morabito R, Campolo M, Esposito E, Cuzzocrea S (2013) Molecular evidence for the involvement of PPAR- $\delta$  and PPAR- $\gamma$  in antiinflammatory and neuroprotective activities of palmitoylethanolamide after spinal cord trauma. *J Neuroinflammation* 10:20
- Perez-Nievas BG, Madrigal JL, Garcia-Bueno B, Zoppi S, Leza JC (2010) Corticosterone basal levels and vulnerability to LPS-induced neuroinflammation in the rat brain. *Brain Res* 1315:159–168.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4:873–884.
- Plaza-Zabala A, Berrendero F, Suarez J, Bermudez-Silva FJ, Fernandez-Espejo E, Serrano A, Pavon FJ, Parsons LH, De Fonseca FR, Maldonado R, Robledo P (2010) Effects of the endogenous PPAR-alpha agonist, oleoylethanolamide on MDMA-induced cognitive deficits in mice. *Synapse* 64:379–389.
- Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE (2006) Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci* 26:12967–12976.
- Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodriguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D (2001) An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 414:209–212.
- Romano A, Karimian Azari E, Tempesta B, Mansouri A, Micioni Di Bonaventura MV, Ramachandran D, Lutz TA, Bedse G, Langhans W, Gaetani S (2014) High dietary fat intake influences the activation of specific hindbrain and hypothalamic nuclei by the satiety factor oleoylethanolamide. *Physiol Behav* pii:S0031-9384(14)00230-3. doi:10.1016/j.physbeh.2014.04.039.
- Saper CB (1998) Neurobiological basis of fever. *Ann NY Acad Sci* 856:90–94.
- Schabitz WR, Giuffrida A, Berger C, Aschoff A, Schwaninger M, Schwab S, Piomelli D (2002) Release of fatty acid amides in a patient with hemispheric stroke: a microdialysis study. *Stroke* 33:2112–2114.
- Schmid PC, Zuzarte-Augustin ML, Schmid HH (1985) Properties of rat liver N-acylethanolamine amidohydrolase. *J Biol Chem* 260:14145–14149.
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with ‘mini-extracts’, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17:6419.
- Steiner AA, Hunter JC, Phipps SM, Nucci TB, Oliveira DL, Roberts JL, Scheck AC, Simmons DL, Romanovsky AA (2009) Cyclooxygenase-1 or -2--which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R485–94.
- Steiner AA, Molchanova AY, Dogan MD, Patel S, Pétervári E, Balaskó M, Wanner SP, Eales J, Oliveira DL, Gavva NR, Almeida MC, Székely M, Romanovsky AA (2011) The hypothermic response to bacterial lipopolysaccharide critically depends on brain CB1, but not CB2 or TRPV1, receptors. *J Physiol* 589:2415–2431.
- Suardiáz M, Estivill-Torrús G, Goicoechea C, Bilbao A, Rodríguez de Fonseca F (2007) Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain* 133:99–110.
- Sun Y, Alexander SP, Garle MJ, Gibson CL, Hewitt K, Murphy SP, Kendall DA, Bennett AJ (2007) Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol* 152:734–743.
- Tellez LA, Medina S, Han W, Ferreira JG, Licona-Limón P, Ren X, Lam TT, Schwartz GJ, de Araujo IE (2013) A gut lipid messenger links excess dietary fat to dopamine deficiency. *Science* 341:800–802.
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology* 93:358–364.
- Yirmiya R (1996) Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Res* 711:163–174.
- Zhou Y, Yang L, Ma A, Zhang X, Li W, Yang W, Chen C, Jin X (2012) Orally administered oleoylethanolamide protects mice from focal cerebral ischemic injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Neuropharmacology* 63:242–249.





## ***DISCUSIÓN GLOBAL***



Numerosas patologías del SNC, entre las que se encuentran enfermedades neurodegenerativas y neuropsiquiátricas, cursan con neuroinflamación. Además de inflamación central, estas enfermedades se caracterizan también por mostrar activación de la respuesta inflamatoria a nivel periférico. El incremento de los mediadores inflamatorios en la periferia a través de su transporte activo, traspasando la barrera hematoencefálica o activando el nervio sensitivo vagal periférico (Dantzer et al., 2000) puede afectar al cerebro y contribuir a la neuroinflamación. En nuestros experimentos tanto la administración de LPS como el consumo intensivo de alcohol o *binge drinking* han elevado los niveles de mediadores pro-inflamatorios. Los resultados del estudio de la expresión temporal de los principales marcadores de neuroinflamación tras el consumo intensivo de alcohol, muestran niveles aumentados de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y de la enzima pro-inflamatoria COX-2 e incremento en la expresión del NF- $\kappa$ B en la corteza frontal de los animales tratados con alcohol en el intervalo comprendido entre la hora y las 6 horas después de la última administración. El pretratamiento con OEA ha demostrado producir **efectos anti-inflamatorios** a nivel periférico y central en ambos estudios, mediante la reducción de los niveles de citoquinas plasmáticas y de citoquinas, quimioquinas y enzimas pro-inflamatorias en la corteza frontal. Estos datos apoyan la participación del sistema inmunológico en las respuestas a una droga de abuso con propiedades neuroinflamatorias, como el alcohol, así como el valor modulador de las aciletanolamidas anti-inflamatorias como la OEA. En este sentido es de destacar que estudios recientes realizados en humanos adictos a cocaína demuestran que tanto los niveles circulantes de citoquinas y quimioquinas, como los de OEA y sus congéneres son biomarcadores de adicción y de severidad de la misma (Araos et al., 2015; Pavón et al., 2013).

La cascada inflamatoria se desencadena tras la activación de los receptores de la inmunidad innata TLR4. El LPS es el ligando endógeno de los TLR4 y el alcohol es capaz de actuar también a través de la activación de este tipo de receptores. Los TLR4 activados producen la transducción de la señal por la vía del NF- $\kappa$ B que al traslocarse al núcleo incrementa la expresión de los mediadores pro-inflamatorios (Crews et al., 2000). Estos mediadores pro-inflamatorios pueden a su vez interaccionar de nuevo con el NF- $\kappa$ B contribuyendo al feedback de control de la inflamación y afectando a la magnitud de la duración de la respuesta inflamatoria (Hoesel y Schmid, 2013). El pretratamiento con OEA ha mostrado disminuir tanto la expresión como la activación



del NF- $\kappa$ B (subunidad p65), considerado un factor de transcripción clave en la respuesta inflamatoria producida tras la administración de LPS y tras el consumo intensivo de alcohol. La OEA ha mostrado previamente una actividad analgésica en modelos animales de dolor visceral e inflamatorio (Suardiaz et al., 2007). Nuestros datos destacan una nueva **actividad anti-inflamatoria** de la OEA en modelos de neuroinflamación.

La activación del NF- $\kappa$ B produce el incremento de la expresión de enzimas pro-inflamatorias y la actividad de éstas aumenta los niveles de ROS/RNS. Al igual que ocurre con las citoquinas, estas ROS/RNS elevadas en el citoplasma pueden interactuar con el NF- $\kappa$ B y provocar de nuevo su activación potenciando la inflamación (Morgan y Liu, 2011). Varios estudios se han dirigido a estudiar las moléculas, factores y cofactores implicados en el estrés oxidativo y nitrosativo como posibles dianas terapéuticas para patologías del SNC que cursan con neuroinflamación (Hsieh y Yang, 2013). Aunque las terapias con antioxidantes en pacientes han demostrado beneficios limitados debido, entre otras, a su baja potencia o a su poca capacidad de penetración en el cerebro, se han utilizado algunos antioxidantes exógenos o se han potenciado los niveles de anti-oxidantes endógenos como complemento a los tratamientos antidepressivos (Xu et al., 2014). En concreto, en el modelo de consumo de alcohol *binge drinking* se ha probado la capacidad neuroprotectora de varias moléculas antioxidantes como el hidroxitolueno butilado o el ácido docosahexaenoico (Crews et al., 2006a; Tajuddin et al., 2014). En nuestros estudios el pretratamiento con OEA induce una regulación a la baja de la expresión de las enzimas pro-inflamatorias (iNOS y COX-2) y una disminución de los niveles de los productos de la actividad de estas enzimas ( $\text{NO}^2^-$ ;  $\text{PGE}_2$ ) incrementados en los animales tratados con alcohol o LPS. Por lo tanto podemos señalar que la OEA presenta **propiedades anti-oxidantes** a través de la reducción del estrés oxidativo y nitrosativo producido en ambos modelos de neuroinflamación.

A parte de las ya mencionadas acciones anti-inflamatorias del pretratamiento con OEA, esta aciletanolamida ha reducido los niveles de MCP-1 en la corteza frontal incrementados por el consumo intensivo de alcohol. La inducción de la expresión de esta quimioquina involucrada en el reclutamiento y la activación de células inmunes, contribuye al daño celular producido en la neuroinflamación. Los niveles elevados en el cerebro de esta quimioquina se han correlacionado con la deficiencia de tiamina o

vitamina B1 (Zahr et al., 2014), déficit característico de la encefalopatía de Wernicke, una patología neuropsiquiátrica que pueden presentar las personas alcohólicas. El incremento de MCP-1 y su actividad quimioatrayente pueden exacerbar la neurodegeneración. Además de estar relacionada con la neurotoxicidad producida por el alcohol, la MCP-1 se ha vinculado con el consumo y la preferencia al alcohol, ya que la ausencia de actividad de MCP-1 reduce ambos comportamientos (Blednov et al., 2005). Por lo que nuestros datos revelan que el pretratamiento con OEA, al reducir los niveles de MCP-1, ejerce un **papel neuroprotector** y podría influir también en el comportamiento del consumo abusivo de alcohol y en patologías asociadas al abuso de esta sustancia, como la encefalopatía de Wernicke.

El consumo de alcohol ha demostrado producir efectos neuroinflamatorios, daño cerebral y neurodegeneración a través de la activación de los TLR4. El alcohol puede producir la activación de estos receptores bien directamente, mediante un incremento en la concentración de endotoxinas por aumento de la traslocación bacteriana, o a través de la molécula HMGB1. Una activación directa de estos receptores por el alcohol es responsable de la respuesta inflamatoria y el daño cerebral (Alfonso-Loeches et al., 2010). Varios estudios han comprobado que el alcohol es capaz de interactuar con ciertos microdominios de membrana o balsas lipídicas (en inglés *lipid rafts*), activando los TLR4, produciendo su internalización y desencadenando la respuesta inflamatoria (Pascual-Lucas et al., 2014). En cuanto a la traslocación bacteriana, el consumo crónico de alcohol en animales produce la hiperpermeabilidad de la pared intestinal e incrementa los niveles de endotoxemia (Keshavarzian et al., 2009). Además, el modelo de consumo intensivo de alcohol en atracón o *binge drinking* ha demostrado ser capaz de provocar esa traslocación intestinal en humanos (Bala et al., 2014), constatándose el incremento de los niveles de LPS en plasma y la consiguiente activación de la respuesta inflamatoria. Un estudio reciente en pacientes con dependencia al alcohol demuestra que el aumento de la permeabilidad bacteriana y del LPS circulante y la activación de la respuesta inflamatoria se encuentran relacionados con los síntomas de la depresión y el deseo por el consumo de alcohol (Leclercq et al., 2012). Por otra parte, las HMGB1 son proteínas localizadas en el núcleo que se liberan al espacio extracelular cuando se activa la respuesta inflamatoria tras un daño. Esta molécula es considerada un marcador de daño neuronal capaz de activar de nuevo a los receptores TLR potenciando la activación de la respuesta inflamatoria. Tras el consumo crónico de alcohol el incremento de los

niveles de HMGB1 y su unión a los TLR4 ha demostrado contribuir a la respuesta inflamatoria y a la activación neuroinmune en el cerebro (Crews et al., 2013). Esta activación neuroinmune vía HMGB1/TLR4 genera un feedback positivo de inducción de la expresión de genes de la inmunidad innata que amplificarán de nuevo la señal de daño de la HMGB1 (Zou y Crews, 2014) induciendo más neuroinflamación y contribuyendo a la neurodegeneración. Nuestros datos muestran que el pretratamiento con OEA disminuye la expresión incrementada de los TLR4 y de las proteínas acopladas que participan en su activación (MD2 y MyD88) en el modelo de consumo de alcohol tipo *binge drinking*. La OEA presenta un **papel anti-inflamatorio** al actuar regulando estos TLR4. Debido a la relación entre los TLR4 y la traslocación bacteriana tras el consumo de alcohol, esta aciletanolamina también podría reducir las consecuencias de esa disfunción intestinal, aunque esto debe ser comprobado en futuros experimentos.

En nuestro estudio el pretratamiento con OEA reduce también los niveles de la HMGB1 indicadora de daño celular. Por lo tanto, la OEA ejerce un importante **papel neuroprotector** al bloquear la activación del sistema inmune innato mediante la inhibición de la cascada de señalización HMGB1/TLR4 asociada a daño celular. El inicio en fases tempranas de la vida en el consumo intensivo de alcohol en atracón o *binge drinking* muestra una regulación al alza de la expresión de HMGB1/TLR4, que persiste en el adulto. Este incremento de HMGB1/TLR4 se correlaciona con el riesgo de padecer adicción al alcohol y otras enfermedades del SNC relacionadas con neuroinflamación (Vetreno et al., 2013). Por lo tanto la OEA, disminuyendo la activación de la vía HMGB1/TLR4, podría actuar frente al desarrollo de estas enfermedades.

Durante los procesos neuroinflamatorios el incremento de los niveles de ROS/RNS causa peroxidación lipídica y la acumulación de los subproductos de ésta son, en parte, responsables de la neurotoxicidad observada. En un estudio previo las aciletanolamidas han demostrado disminuir la peroxidación lipídica a nivel plasmático (Zolese et al., 2008). Nuestros datos muestran que la OEA y la PEA reducen la peroxidación lipídica en la corteza frontal tras la administración de LPS y después del consumo intensivo de alcohol. Estas aciletanolamidas al regular los niveles de los subproductos de la peroxidación lipídica MDA y 4-HNE disminuyen la toxicidad causada por estos compuestos en las células.

El 4-HNE es un producto de la peroxidación lipídica cuya acumulación resulta extremadamente tóxica para las células. Este compuesto además de producir necrosis también puede producir la muerte celular por activación de la vía de las caspasas apoptóticas. Por una parte, la caspasa 8 es considerada una caspasa iniciadora de la señal apoptótica, aunque también ha demostrado ejercer efectos no apoptóticos. Una de las actividades no apoptóticas observadas es su participación en la trasducción de la señal inflamatoria desde los TLR4 hasta el NF- $\kappa$ B en células microgliales (Viceconte et al., 2015). En la cascada apoptótica la caspasa 8 actúa como una molécula iniciadora del proceso capaz de dividir a otras caspasas, entre las que se encuentran la caspasa 3, activándolas. Un estudio con cultivo de miocitos observa que el bloqueo de la activación de los TLR4 atenúa la apoptosis inducida por el incremento de glucosa y describe la vía de señalización que relaciona la activación de TLR4/MyD88, con caspasa 8 y la posterior activación de caspasa 3 como una secuencia (TLR4/MyD88/caspasa8/caspasa3) que desencadena la apoptosis (Liu et al., 2013). En nuestro estudio hemos visto que la expresión incrementada de caspasa 8, tras el consumo intensivo de alcohol, se ve reducida por el pretratamiento con OEA, por lo que ésta podría ejercer una acción anti-apoptótica y reducir la posible activación de la vía inflamatoria del NF- $\kappa$ B por caspasa 8. Por otra parte, la caspasa 3 es considerada efectora de la apoptosis. En el cerebro en desarrollo de ratas recién nacidas el alcohol ha demostrado incrementar los niveles de caspasa 3 produciendo una importante neurodegeneración (Olney et al., 2002). Esta neurodegeneración se asocia con profundos déficits de memoria y aprendizaje (Wozniak et al., 2004). Se ha comprobado que el incremento de caspasa 3, producido por el alcohol, tiene lugar por la activación del NF- $\kappa$ B y varios compuestos naturales han demostrado capacidad para inhibir esta activación reduciendo el daño cerebral y los déficits cognitivos (Tiwari y Chopra, 2011). También se ha comprobado que el TLR4 es un factor esencial en el incremento de la actividad de caspasa 3 en la corteza cerebral producido por el consumo crónico de alcohol (Alfonso-Loeches et al., 2010). En nuestro estudio el pretratamiento con OEA reduce tanto la expresión como la actividad de caspasa 3 en la corteza frontal, incrementadas tras el consumo de alcohol *binge drinking*. Estos datos reflejan una importante **función neuroprotectora** de la OEA frente a la neurodegeneración producida por la vía de las caspasas tras el consumo intensivo de alcohol, pudiendo también indicar un posible papel de la OEA en la mejora de los déficits cognitivos causados por el alcohol.

En nuestro estudio de consumo de alcohol tipo *binge drinking* hemos conseguido que los animales administrados con alcohol presenten unos niveles en sangre elevados y sostenidos durante el transcurso del experimento. El pre-tratamientos con OEA no muestra alteración de esos niveles de alcohol en sangre. Estos datos concuerdan con los encontrados en otro estudio en el que el pre-tratamiento con OEA no modifica el incremento de los niveles de alcohol en plasma tras la administración aguda (Bilbao et al., 2015), por lo que podemos decir que la OEA no muestra ningún efecto sobre el metabolismo del alcohol.

Tanto la administración de LPS como el consumo de alcohol pueden modificar las respuestas de fase aguda fisiológicas y comportamentales. Una de esas respuestas fisiológicas es la alteración de la actividad del eje HPA. El alcohol es capaz de alterar el eje HPA e incrementar los niveles de GC (Rivier, 1996). Estos GC pueden interaccionar con el sistema de recompensa del cerebro contribuyendo a los efectos de refuerzo del alcohol (Stephens y Wan, 2012). En concreto, el modelo de consumo de alcohol tipo *binge drinking* ha demostrado incrementar los niveles de corticosterona pudiendo estos niveles elevados participar en la neurodegeneración (Cippitelli et al., 2014). Niveles elevados de GC, junto con el incremento de las citoquinas, producen la llamada resistencia a GC y son responsables de la degeneración producida en el cerebro en patologías como el Parkinson, el Alzheimer o el Huntington (Vyas y Maatouk, 2013). Nuestros datos muestran que el pre-tratamiento con dosis repetidas de OEA es capaz de reducir los niveles de corticosterona incrementados en el modelo de consumo de alcohol tipo *binge drinking*, por lo que la OEA a través de la regulación de la actividad del eje HPA realiza una **función neuroprotectora**. En cambio esta reducción de los niveles de corticosterona no se produce ni con la OEA ni con la PEA en el experimento de administración de LPS. Las diferencias encontradas en relación a este efecto de la OEA sobre los niveles de GC podrían explicarse por el hecho de que en el modelo de LPS se realiza una única administración de OEA mientras que en el de alcohol se producen repetidas administraciones que serían capaces de actuar sobre la hiperactividad del eje. En este sentido, un modelo animal de estrés en el que se administra la OEA durante varios días consecutivos también refleja que esta aciletanolamida es capaz de reducir los valores de corticosterona en plasma (Jin et al., 2015). Aunque existe una clara relación entre el sistema endocannabinoide y el eje HPA, mediante una participación dual de los endocannabinoides en el feedback de activación/inhibición del eje (Hill et al., 2010), es

necesario un estudio más exhaustivo para explicar el mecanismo de acción concreto de las aciletanolamidas en la regulación de este eje.

La administración de LPS produce otra respuesta de fase aguda fisiológica, la alteración de la termorregulación corporal. Esta alteración se produce como consecuencia de la activación del eje HPA y del incremento de la inflamación sistémica. Las distintas respuestas térmicas que puede producir el LPS (hipotermia, hipotermia precedida de fiebre o fiebre) dependen del serotipo utilizado. En nuestro estudio, el serotipo O11:B4 produce hipotermia inmediatamente tras la administración de LPS que se prolonga hasta 3-6 horas después. Un estudio previo con este mismo serotipo de LPS demostró producir una potente hipotermia, relacionada con la capacidad del LPS para prolongar en el tiempo el incremento de los niveles de citoquinas antipiréticas como el TNF- $\alpha$  (Akarsu y Mamuk, 2007). En este proceso de hipotermia causada por el LPS también se han visto incrementados los niveles de moléculas antipiréticas desde los macrófagos periféricos y la mediación de las PG en esta acción hipotérmica (Derijk et al., 1994).

El LPS ha demostrado ser capaz de incrementar los niveles de marcadores hipotalámicos de actividad pirógena endógena. Tras una infección o daño, desde diferentes tipos de células inmunes se incrementa la expresión de IL-1 $\beta$  (considerada pirógeno endógeno) que es capaz de regular la temperatura en el hipotálamo (Quan et al., 1998). Las enzimas COX-2 y mPGES-1 son esenciales en la respuesta a pirógenos endógenos y exógenos, ya que están implicadas en la formación de la PGE<sub>2</sub> (inductora de fiebre) y se ha comprobado que los inhibidores de estas enzimas producen disminución de la fiebre (Li et al., 2001). Durante los procesos inflamatorios la PGE<sub>2</sub> muestra niveles incrementados tanto en la periferia como en el SNC. La PGE<sub>2</sub> puede actuar en las zonas hipotalámicas encargadas de la regulación de la temperatura corporal induciendo fiebre. La activación de los receptores de PGE<sub>2</sub> en las células gliales produce el incremento de AMPc que es el encargado de activar las neuronas localizadas en el hipotálamo y desencadenar una serie de mecanismos que producen hipertermia. Se ha comprobado que la activación de los TLR4 hipotalámicos produce en conjunto el incremento de los niveles de citoquinas pirógenas, de enzimas COX-2 y mPGES-1 y de PGE<sub>2</sub> que activan los receptores hipotalámicos y provocan fiebre (Dinarello, 2004).

Nuestro estudio de la temperatura rectal de los animales muestra que la bajada de temperatura se produce inmediatamente después de la inyección de LPS y se recupera

entre las 3 y las 6 horas después. Los pre-tratamientos con OEA y con PEA son capaces de acentuar levemente la hipotermia producida por la administración de LPS durante esas primeras horas tras la inyección. Se encuentra que en torno a las 3 horas tras la administración de LPS los marcadores hipotalámicos de actividad pirógena endógena IL-1 $\beta$ , COX-2, mPGES-1 y PGE<sub>2</sub> están incrementados, lo que podría interpretarse como un intento del organismo por recuperar la temperatura corporal y mantener la homeostasis. Los pre-tratamientos con OEA y con PEA disminuyen los niveles de estos marcadores incrementados por el LPS. La hipotermia se considera un mecanismo de supervivencia para disminuir la demanda metabólica ante situaciones de depleción de energía, daño tisular o infección. En conjunto nuestros resultados muestran que la OEA y la PEA, actuando sobre la termorregulación, podrían producir efectos beneficiosos frente a una infección o un daño. En el caso de drogas de abuso neurotóxicas que actúan incrementando la temperatura corporal como el MDMA (éxtasis) la OEA podría tener acciones protectoras como sugieren estudios recientes (Plaza- Zabala et al., 2010).

Es interesante destacar que el alcohol también es capaz de alterar la termorregulación corporal mediante un mecanismo complejo que depende de diversas variables externas e internas. El consumo agudo de alcohol produce, generalmente, una disminución de la temperatura corporal. Sin embargo, en consumidores crónicos aparece hipertermia directamente relacionada con la severidad del síndrome de abstinencia y con el tiempo transcurrido tras el último consumo de alcohol (Gordon, 2010). Los resultados de nuestro estudio sugieren que la OEA y la PEA podrían ayudar a regular el incremento de la temperatura corporal y mejorar los síntomas del síndrome de abstinencia al alcohol, como ya se ha estudiado con la OEA para los síntomas de vocalizaciones, rigidez y temblor en la cabeza y temblor corporal (Bilbao et al., 2015), aunque es necesaria más investigación al respecto.

Como se ha comentado, además de las respuestas de fase aguda fisiológicas, el LPS produce respuestas comportamentales. Una de las principales respuestas de fase aguda comportamentales producidas por la administración de LPS y por el consumo de alcohol es la anhedonia. La anhedonia es uno de los síntomas del *sickness behavior* que se define como la incapacidad de sentir placer con actividades de recompensa naturales. Se sabe que la anhedonia es uno de los síntomas comunes que presentan los pacientes que sufren trastornos psiquiátricos, entre los que se encuentran la depresión y la dependencia a drogas como el alcohol. Estos dos trastornos, el consumo abusivo de

alcohol y la depresión, presentan un alto rango de comorbilidad. El alcohol puede empeorar los síntomas de la depresión y/o contribuir a la aparición de esta enfermedad. Además, un estudio en consumidores habituales de alcohol tipo *binge drinking* ha desatacado la capacidad de este modelo para provocar síntomas depresivos (Paljarvi et al., 2009). Es interesante señalar que, tanto la regulación de las propiedades hedónicas de la comida, como las de las drogas de abuso presentan una similitud en los mecanismos desencadenados a nivel cerebral. El consumo abusivo de estos dos tipos de sustancias conduce a respuestas neuroadaptativas similares en los circuitos de recompensa del cerebro (Kenny, 2011). Estudios previos en los que la OEA actúa como modulador de la ingesta de comida con alto contenido graso o del consumo de nicotina, esta aciletanolamida ha demostrado su capacidad de actuación sobre el estado motivacional. La OEA ejerce esta regulación a través del sistema de recompensa mediado por la estimulación de la función dopaminérgica (Tellez et al., 2013; Mascia et al., 2011). La anhedonia está relacionada con un déficit en la transmisión dopaminérgica del sistema de recompensa (Heinz et al., 1994) y se encuentra involucrada tanto en el paso del consumo esporádico de las drogas de abuso al consumo abusivo, como en la recaída (Hatzigiakoumis et al., 2011). Es frecuente, por tanto, que aparezcan anhedonia y otros síntomas de depresión durante la fase de deseo de consumo de alcohol y en el síndrome de abstinencia (Janiri et al., 2005).

Nuestros datos muestran que la OEA es capaz de modificar el estado motivacional negativo de los animales. El pretratamiento con OEA incrementa el grado de preferencia por la sacarina de los animales tratados con LPS hasta los niveles de los animales control, sin modificar el volumen de líquido total ingerido. La OEA siendo capaz de reducir la anhedonia podría, por tanto, influir en el comportamiento de consumo de alcohol y en los síntomas del síndrome de abstinencia.

Aunque la PEA ha mostrado actividades anti-inflamatorias y anti-oxidantes similares a las de la OEA en la neuroinflamación inducida por el LPS, el pretratamiento con PEA no ha mostrado la capacidad de la OEA de inhibir la anhedonia. Por lo que la OEA podría ser más beneficiosa que la PEA a nivel de regulación de las respuestas comportamentales.

Tanto la OEA como la PEA son ligandos endógenos capaces de activar los PPAR $\alpha$ . Como se ha comentado en la introducción de esta tesis, la activación de los PPAR $\alpha$  ha demostrado producir efectos anti-inflamatorios. La administración sistémica crónica de



agonistas sintéticos de estos receptores reduce los niveles de varios factores pro-inflamatorios incrementados por el LPS en el cerebro de ratón (Wang y Namura, 2011). La administración de PEA ha demostrado disminuir la inflamación periférica y la hiperalgesia mediante la activación de los PPAR $\alpha$ , sugiriendo que estos efectos podrían producirse por inhibición de la actividad del NF- $\kappa$ B (D'Agostino et al., 2007; 2009). La PEA parece ejercer acciones neuroprotectoras también mediante éstos receptores (Di Cesare Mannelli et al., 2013). La OEA, por su parte, además de ejercer sus funciones metabólicas a través de los PPAR $\alpha$ , también ha mostrado a través de este tipo de receptores, al menos en parte, actividad neuroprotectora frente a isquemia cerebral (Sun et al., 2007; Zhou et al., 2012), y frente a neurotoxinas como la 6-hidroxidopamina (Galan-Rodriguez et al., 2009). Las acciones de la OEA en la regulación del consumo de nicotina (Mascia et al., 2011) se consideran mediadas por los PPAR $\alpha$ . Un estudio reciente ha demostrado que la OEA ejerce un papel homeostático en el consumo de alcohol. La administración de alcohol aumenta los niveles de OEA en plasma, en tejidos periféricos y en cerebro. Los niveles incrementados de OEA regulan el consumo de alcohol, la respuesta motivacional del alcohol y la aparición de los síntomas del síndrome de abstinencia generados tras el consumo crónico (Bilbao et al., 2015). La OEA realiza estas actividades a través de la activación de los PPAR $\alpha$ . Sería necesario el diseño de estudios adicionales encaminados a esclarecer las dianas farmacológicas concretas por la que estas dos aciletanolamidas ejercen los efectos beneficiosos mostrados en los experimentos de neuroinflamación llevados a cabo en esta tesis.

Las acciones anti-inflamatorias, anti-oxidantes y neuroprotectoras que ha demostrado tener la OEA, similares a las de la PEA, en estos dos estudios, indican su potencial como futuros tratamientos para patologías relacionadas con activación del sistema inmune y que cursen con neuroinflamación. Son especialmente interesantes los datos que indican que la OEA regula la señal de daño HMGB1/TLR4, pudiendo servir esta aciletanolamida como potencial terapéutico frente a la neuroinflamación, la neurodegeneración y el desarrollo de la adicción al alcohol. Además, la OEA ha demostrado tener capacidad de regulación de las respuestas de fase aguda destacando su potencial neuroprotector y modulador del comportamiento motivacional, por lo que podría ser beneficiosa para aliviar el estado emocional negativo asociado a enfermedades del SNC que cursan con neuroinflamación.





# ***CONCLUSIONES***



1. El consumo intensivo de alcohol o *binge drinking* origina un proceso neuroinflamatorio en la corteza cerebral cuyos mediadores pro-inflamatorios son observables en su mayoría en el período comprendido entre la hora y las 6 horas tras la última administración de alcohol. Esta neuroinflamación asociada al consumo intensivo participa en el daño neuronal inducido por el alcohol.
2. La OEA muestra propiedades anti-inflamatorias a nivel periférico y en la corteza frontal tras el consumo intensivo de alcohol y la administración sistémica de LPS. Los efectos anti-inflamatorios en la corteza frontal están relacionados con la inhibición de la vía del NF- $\kappa$ B y de la producción de citoquinas, quimioquinas, prostaglandinas y enzimas pro-inflamatorias.
3. La OEA presenta propiedades antioxidantes reduciendo el estrés oxidativo y nitrosativo tras la administración de alcohol tipo *binge* o la inyección sistémica de LPS. La acción anti-inflamatoria y antioxidante de la OEA es comparable a la de la aciletanolamida PEA en un modelo de neuroinflamación experimental inducido por LPS.
4. El pre-tratamiento con OEA regula la activación de los receptores de inmunidad innata TLR4 e inhibe la cascada de señalización HMGB1/TLR4 asociada a daño celular, por lo que posee un papel no sólo anti-inflamatorio sino también neuroprotector frente al consumo intensivo de alcohol o *binge drinking*.
5. La función neuroprotectora del pretratamiento con OEA también se refleja en la reducción de la peroxidación lipídica, que comparte con la PEA, y la inhibición de caspasas apoptóticas activadas durante el proceso neuroinflamatorio.
6. El pre-tratamiento agudo con OEA y PEA no es capaz de alterar los niveles plasmáticos de corticosterona tras la administración sistémica de LPS. Sin embargo, el pre-tratamiento con varias dosis de OEA inhibe el incremento de corticosterona inducido tras el consumo intensivo de alcohol o *binge drinking*, sin afectar a los niveles plasmáticos de alcohol.
7. Tanto la OEA como la PEA disminuyen los marcadores hipotalámicos de actividad pirógena endógena incrementados tras la neuroinflamación y potencian

la respuesta hipotérmica observada tras la administración sistémica de LPS, probablemente en un intento de mantener la homeostasis frente al daño cerebral.

8. El pre-tratamiento con OEA, a diferencia de la PEA, es capaz de regular el estado motivacional negativo a largo plazo asociado a la neuroinflamación, ya que previene la anhedonia producida por LPS induciendo un estado motivacional positivo similar al de animales control en un test de preferencia a la sacarina, sin afectar al consumo de líquido total.
9. Consideradas en su conjunto, estas conclusiones indican que la OEA tiene propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes similares a las de la PEA, posee un papel neuroprotector frente al daño cerebral relacionado con la respuesta neuroinmune/inflamatoria en la corteza frontal y es capaz de regular las respuestas de fase aguda y el comportamiento motivacional alterado, proponiéndose por todo ello como una alternativa farmacológica para tratar patologías neuropsiquiátricas que cursan con neuroinflamación.







# ***BIBLIOGRAFÍA***



Abernathy K, Chandler LJ, Woodward JJ. Alcohol and the prefrontal cortex. *Int Rev Neurobiol.* 2010;91:289-320.

Achur RN, Freeman WM, Vrana KE. Circulating cytokines as biomarkers of alcohol abuse and alcoholism. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010 Mar;5(1):83-91.

Agrawal RG, Hewetson A, George CM, Syapin PJ, Bergeson SE. Minocycline reduces ethanol drinking. *Brain Behav Immun.* 2011 Jun;25 Suppl 1:S165-9.

Ahern GP. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem.* 2003 Aug 15;278(33):30429-34.

Ahmad A, Crupi R, Impellizzeri D, Campolo M, Marino A, Esposito E, et al. Administration of palmitoylethanolamide (PEA) protects the neurovascular unit and reduces secondary injury after traumatic brain injury in mice. *Brain Behav Immun.* 2012a Nov;26(8):1310-21.

Ahmad A, Genovese T, Impellizzeri D, Crupi R, Velardi E, Marino A, et al. Reduction of ischemic brain injury by administration of palmitoylethanolamide after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 2012b Oct 5;1477:45-58.

Ahn K, McKinney MK, Cravatt BF. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem Rev.* 2008 May;108(5):1687-707.

Akarsu ES, Mamuk S. Escherichia coli lipopolysaccharides produce serotype-specific hypothermic response in biotelemetered rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 May;292(5):R1846-50.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):783-801.

Alfonso-Loeches S, Guerri C. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2011 Jan-Feb;48(1):19-47.

Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J Neurosci.* 2010 Jun 16;30(24):8285-95.

Allan SM, Rothwell NJ. Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003 Oct 29;358(1438):1669-77.

Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Oct;2(10):734-44.

Ambrosini E, Aloisi F. Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res.* 2004 May;29(5):1017-38.

Andre C, O'Connor JC, Kelley KW, Lestage J, Dantzer R, Castanon N. Spatio-temporal differences in the profile of murine brain expression of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to peripheral lipopolysaccharide administration. *J Neuroimmunol.* 2008 Aug 30;200(1-2):90-9.

Andreasen AS, Krabbe KS, Krogh-Madsen R, Taudorf S, Pedersen BK, Moller K. Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Curr Med Chem.* 2008;15(17):1697-705.

Araos P, Pedraz M, Serrano A, Lucena M, Barrios V, Garcia-Marchena N, et al. Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity. *Addict Biol.* 2015 Jul;20(4):756-72.

- Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
- Bailey SL, Carpentier PA, McMahon EJ, Begolka WS, Miller SD. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit Rev Immunol*. 2006;26(2):149-88.
- Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, et al. Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J*. 2001 Feb;15(2):300-2.
- Bala S, Marcos M, Gattu A, Catalano D, Szabo G. Acute binge drinking increases serum endotoxin and bacterial DNA levels in healthy individuals. *PLoS One*. 2014 May 14;9(5):e96864.
- Bala S, Tang A, Catalano D, Petrusek J, Taha O, Kodys K, et al. Induction of Bcl-3 by acute binge alcohol results in toll-like receptor 4/LPS tolerance. *J Leukoc Biol*. 2012 Sep;92(3):611-20.
- Basu A, Krady JK, O'Malley M, Styren SD, DeKosky ST, Levison SW. The type 1 interleukin-1 receptor is essential for the efficient activation of microglia and the induction of multiple proinflammatory mediators in response to brain injury. *J Neurosci*. 2002 Jul 15;22(14):6071-82.
- Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001 Sep;11(9):372-7.
- Beishuizen A, Thijs LG. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J Endotoxin Res*. 2003;9(1):3-24.
- Berger C, Schmid PC, Schabitz WR, Wolf M, Schwab S, Schmid HH. Massive accumulation of N-acylethanolamines after stroke. Cell signalling in acute cerebral ischemia? *J Neurochem*. 2004 Mar;88(5):1159-67.
- Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Feb;7(2):99-109.
- Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*. 2007 Feb;55(3):233-8.
- Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, Acton PD, Davoodi N, De Haes P, et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:271359.
- Bilbao A, Blanco E, Luque-Rojas MJ, Suarez J, Palomino A, Vida M, et al. Oleoylethanolamide dose-dependently attenuates cocaine-induced behaviours through a PPARalpha receptor-independent mechanism. *Addict Biol*. 2013 Jan;18(1):78-87.
- Bilbao A, Serrano A, Cippitelli A, Pavon FJ, Giuffrida A, Suarez J, et al. Role of the satiety factor oleoylethanolamide in alcoholism. *Addict Biol*. 2015 Jun 2.
- Bisogno T, Martire A, Petrosino S, Popoli P, Di Marzo V. Symptom-related changes of endocannabinoid and palmitoylethanolamide levels in brain areas of R6/2 mice, a transgenic model of Huntington's disease. *Neurochem Int*. 2008 Jan;52(1-2):307-13.
- Blanco AM, Valles SL, Pascual M, Guerri C. Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):6893-9.
- Blednov YA, Benavidez JM, Geil C, Perra S, Morikawa H, Harris RA. Activation of inflammatory signaling by lipopolysaccharide produces a prolonged increase of voluntary alcohol intake in mice. *Brain Behav Immun*. 2011 Jun;25 Suppl 1:S92-S105.

Blednov YA, Bergeson SE, Walker D, Ferreira VM, Kuziel WA, Harris RA. Perturbation of chemokine networks by gene deletion alters the reinforcing actions of ethanol. *Behav Brain Res.* 2005 Nov 30;165(1):110-25.

Blednov YA, Ponomarev I, Geil C, Bergeson S, Koob GF, Harris RA. Neuroimmune regulation of alcohol consumption: behavioral validation of genes obtained from genomic studies. *Addict Biol.* 2012 Jan;17(1):108-20.

Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol.* 2005 Jun;76(2):77-98.

Bouaboula M, Hilairiet S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol.* 2005 Jul 11;517(3):174-81.

Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 2007a Nov;152(5):567-75.

Brown GC. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Trans.* 2007b Nov;35(Pt 5):1119-21.

Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002 Nov;61(11):1013-21.

Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci.* 1996 Jun 15;16(12):3934-42.

Calignano A, La Rana G, Piomelli D. Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur J Pharmacol.* 2001 May 11;419(2-3):191-8.

Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact.* 2006 Mar 23;5:13.

Caso JR, Hurtado O, Pereira MP, Garcia-Bueno B, Menchen L, Alou L, et al. Colonic bacterial translocation as a possible factor in stress-worsening experimental stroke outcome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009 Apr;296(4):R979-85.

Catena-Dell'Osso M, Bellantuono C, Consoli G, Baroni S, Rotella F, Marazziti D. Inflammatory and neurodegenerative pathways in depression: a new avenue for antidepressant development? *Curr Med Chem.* 2011;18(2):245-55.

Cazareth J, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J, Petit-Paitel A. Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *J Neuroinflammation.* 2014 Jul 28;11:132,2094-11-132.

Celec P. Nuclear factor kappa B--molecular biomedicine: the next generation. *Biomed Pharmacother.* 2004 Jul-Aug;58(6-7):365-71.

Centonze D, Finazzi-Agro A, Bernardi G, Maccarrone M. The endocannabinoid system in targeting inflammatory neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2007 Apr;28(4):180-7.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 15;99(21):13926-31.

Chang YH, Lee ST, Lin WW. Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. *J Cell Biochem.* 2001;81(4):715-23.

Choi SH, Aid S, Bosetti F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Apr;30(4):174-81.

Cimini A, Benedetti E, Cristiano L, Sebastiani P, D'Amico MA, D'Angelo B, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and retinoic acid receptors (RXRs) in rat cortical neurons. *Neuroscience.* 2005;130(2):325-37.

Cippitelli A, Damadzic R, Hamelink C, Brunnquell M, Thorsell A, Heilig M, et al. Binge-like ethanol consumption increases corticosterone levels and neurodegeneration whereas occupancy of type II glucocorticoid receptors with mifepristone is neuroprotective. *Addict Biol.* 2014 Jan;19(1):27-36.

Clark KH, Wiley CA, Bradberry CW. Psychostimulant abuse and neuroinflammation: emerging evidence of their interconnection. *Neurotox Res.* 2013 Feb;23(2):174-88.

Coleman LG,Jr, He J, Lee J, Styner M, Crews FT. Adolescent binge drinking alters adult brain neurotransmitter gene expression, behavior, brain regional volumes, and neurochemistry in mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011 Apr;35(4):671-88.

Collins MA, Corso TD, Neafsey EJ. Neuronal degeneration in rat cerebrocortical and olfactory regions during subchronic "binge" intoxication with ethanol: possible explanation for olfactory deficits in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996 Apr;20(2):284-92.

Conductier G, Blondeau N, Guyon A, Nahon JL, Rovere C. The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *J Neuroimmunol.* 2010 Jul 27;224(1-2):93-100.

Correale J, Villa A. The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol.* 2004 Nov;251(11):1304-16.

Costa B, Conti S, Giagnoni G, Colleoni M. Therapeutic effect of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, in rat acute inflammation: inhibition of nitric oxide and cyclo-oxygenase systems. *Br J Pharmacol.* 2002 Oct;137(4):413-20.

Courtney KE, Polich J. Binge drinking in young adults: Data, definitions, and determinants. *Psychol Bull.* 2009 Jan;135(1):142-56.

Cravatt BF, Lichtman AH. The enzymatic inactivation of the fatty acid amide class of signaling lipids. *Chem Phys Lipids.* 2002 Dec 31;121(1-2):135-48.

Crews F, Nixon K, Kim D, Joseph J, Shukitt-Hale B, Qin L, et al. BHT blocks NF-kappaB activation and ethanol-induced brain damage. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006a Nov;30(11):1938-49.

Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, et al. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006b Apr;30(4):720-30.

Crews FT, Braun CJ, Hoplight B, Switzer RC,3rd, Knapp DJ. Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000 Nov;24(11):1712-23.

Crews FT, Qin L, Sheedy D, Vetreno RP, Zou J. High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence. *Biol Psychiatry.* 2013 Apr 1;73(7):602-12.

Crews FT, Zou J, Qin L. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav Immun.* 2011 Jun;25 Suppl 1:S4-S12.

Cui C, Shurtleff D, Harris RA. Neuroimmune mechanisms of alcohol and drug addiction. *Int Rev Neurobiol.* 2014;118:1-12.

- Cunningham C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia*. 2013 Jan;61(1):71-90.
- Cunningham C, Wilcockson DC, Champion S, Lunnon K, Perry VH. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J Neurosci*. 2005 Oct 5;25(40):9275-84.
- da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem*. 2001 Jun 15;276(24):21129-35.
- D'Agostino G, La Rana G, Russo R, Sasso O, Iacono A, Esposito E, et al. Central administration of palmitoylethanolamide reduces hyperalgesia in mice via inhibition of NF-kappaB nuclear signalling in dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol*. 2009 Jun 24;613(1-3):54-9.
- D'Agostino G, La Rana G, Russo R, Sasso O, Iacono A, Esposito E, et al. Acute intracerebroventricular administration of palmitoylethanolamide, an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist, modulates carrageenan-induced paw edema in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Sep;322(3):1137-43.
- Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol*. 2004 Oct 1;500(1-3):399-411.
- Dantzer R, Konsman JP, Bluthé RM, Kelley KW. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci*. 2000 Dec 20;85(1-3):60-5.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jan;9(1):46-56.
- Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:707-35.
- Davis CN, Mann E, Behrens MM, Gaidarova S, Rebek M, Rebek J, Jr, et al. MyD88-dependent and -independent signaling by IL-1 in neurons probed by bifunctional Toll/IL-1 receptor domain/BB-loop mimetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 21;103(8):2953-8.
- Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2002 Oct;2(10):748-59.
- De Bellis MD, Narasimhan A, Thatcher DL, Keshavan MS, Soloff P, Clark DB. Prefrontal cortex, thalamus, and cerebellar volumes in adolescents and young adults with adolescent-onset alcohol use disorders and comorbid mental disorders. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005 Sep;29(9):1590-600.
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev*. 2003 Aug;24(4):488-522.
- De La Garza R, 2nd. Endotoxin- or pro-inflammatory cytokine-induced sickness behavior as an animal model of depression: focus on anhedonia. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(4-5):761-70.
- Dean JM, Wang X, Kaindl AM, Gressens P, Fleiss B, Hagberg H, et al. Microglial MyD88 signaling regulates acute neuronal toxicity of LPS-stimulated microglia in vitro. *Brain Behav Immun*. 2010 Jul;24(5):776-83.
- Degn M, Lambertsen KL, Petersen G, Meldgaard M, Artmann A, Clausen BH, et al. Changes in brain levels of N-acylethanolamines and 2-arachidonoylglycerol in focal cerebral ischemia in mice. *J Neurochem*. 2007 Dec;103(5):1907-16.



- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5;274(45):32048-54.
- Delerive P, De Bosscher K, Vanden Berghe W, Fruchart JC, Haegeman G, Staels B. DNA binding-independent induction of IkappaBalpha gene transcription by PPARalpha. *Mol Endocrinol*. 2002 May;16(5):1029-39.
- Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *J Biol Chem*. 2000 Nov 24;275(47):36703-7.
- Depino A, Ferrari C, Pott Godoy MC, Tarelli R, Pitossi FJ. Differential effects of interleukin-1beta on neurotoxicity, cytokine induction and glial reaction in specific brain regions. *J Neuroimmunol*. 2005 Nov;168(1-2):96-110.
- Derijk RH, Van Kampen M, Van Rooijen N, Berkenbosch F. Hypothermia to endotoxin involves reduced thermogenesis, macrophage-dependent mechanisms, and prostaglandins. *Am J Physiol*. 1994 Jan;266(1 Pt 2):R1-8.
- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999 Oct;20(5):649-88.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992 Dec 18;258(5090):1946-9.
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*. 1996 Nov 7;384(6604):39-43.
- Di Cesare Mannelli L, D'Agostino G, Pacini A, Russo R, Zanardelli M, Ghelardini C, et al. Palmitoylethanolamide is a disease-modifying agent in peripheral neuropathy: pain relief and neuroprotection share a PPAR-alpha-mediated mechanism. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:328797.
- Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov*. 2008 May;7(5):438-55.
- Dinareello CA. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res*. 2004;10(4):201-22.
- Dixon DR, Darveau RP. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *J Dent Res*. 2005 Jul;84(7):584-95.
- Dogan MD, Ataoglu H, Akarsu ES. Characterization of the hypothermic component of LPS-induced dual thermoregulatory response in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002 May;72(1-2):143-50.
- Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*. 2010 Mar 1;67(5):446-57.
- Drew PD, Xu J, Storer PD, Chavis JA, Racke MK. Peroxisome proliferator-activated receptor agonist regulation of glial activation: relevance to CNS inflammatory disorders. *Neurochem Int*. 2006 Jul;49(2):183-9.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82(1):47-95.
- Drugan RC, Wiedholz LM, Holt A, Kent S, Christianson JP. Environmental and immune stressors enhance alcohol-induced motor ataxia in rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007 Jan;86(1):125-31.

Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE*. 2003 Feb 25;2003(171):re3.

Edenberg HJ, Xuei X, Wetherill LF, Bierut L, Bucholz K, Dick DM, et al. Association of NFKB1, which encodes a subunit of the transcription factor NF-kappaB, with alcohol dependence. *Hum Mol Genet*. 2008 Apr 1;17(7):963-70.

Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 11;100(23):13632-7.

Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience*. 2009 Feb 6;158(3):1021-9.

Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, et al. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron*. 2006 Jan 5;49(1):67-79.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495-516.

Erickson MA, Banks WA. Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: multiplex quantification with path analysis. *Brain Behav Immun*. 2011 Nov;25(8):1637-48.

Erickson MA, Dohi K, Banks WA. Neuroinflammation: a common pathway in CNS diseases as mediated at the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*. 2012;19(2):121-30.

Eriksson C, Van Dam AM, Lucassen PJ, Bol JG, Winblad B, Schultzberg M. Immunohistochemical localization of interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta converting enzyme/caspase-1 in the rat brain after peripheral administration of kainic acid. *Neuroscience*. 1999;93(3):915-30.

Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1254-66.

Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology*. 2001 Oct;142(10):4195-202.

Esposito E, Cuzzocrea S. Palmitoylethanolamide in homeostatic and traumatic central nervous system injuries. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013 Feb 1;12(1):55-61.

Esser MB, Hedden SL, Kanny D, Brewer RD, Gfroerer JC, Naimi TS. Prevalence of alcohol dependence among US adult drinkers, 2009-2011. *Prev Chronic Dis*. 2014 Nov 20;11:E206.

Facchinetti F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A. Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Glia*. 2003 Jan 15;41(2):161-8.

Faingold CL. The Majchrowicz binge alcohol protocol: an intubation technique to study alcohol dependence in rats. *Curr Protoc Neurosci*. 2008 Jul;Chapter 9:Unit 9.28.

Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 11;92(8):3376-80.

Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*. 2007 Mar;28(3):138-45.

- Farke W, Anderson P. Binge drinking in Europe. *Adicciones*. 2007;19(4):333-9.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem*. 2007 May;101(3):577-99.
- Farquhar-Smith WP, Rice AS. A novel neuroimmune mechanism in cannabinoid-mediated attenuation of nerve growth factor-induced hyperalgesia. *Anesthesiology*. 2003 Dec;99(6):1391-401.
- Ferguson LB, Most D, Blednov YA, Harris RA. PPAR agonists regulate brain gene expression: relationship to their effects on ethanol consumption. *Neuropharmacology*. 2014 Nov;86:397-407.
- Fernandez-Lizarbe S, Montesinos J, Guerri C. Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *J Neurochem*. 2013 Jul;126(2):261-73.
- Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Guerri C. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J Immunol*. 2009 Oct 1;183(7):4733-44.
- Figiel I. Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2008;68(4):526-34.
- Forlenza MJ, Miller GE. Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosom Med*. 2006 Jan-Feb;68(1):1-7.
- Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener*. 2009 Nov 16;4:47,1326-4-47.
- Frankola KA, Greig NH, Luo W, Tweedie D. Targeting TNF-alpha to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011 May;10(3):391-403.
- Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, et al. Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature*. 2003 Sep 4;425(6953):90-3.
- Galanos C, Luderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, et al. Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem*. 1985 Apr 1;148(1):1-5.
- Galan-Rodriguez B, Suarez J, Gonzalez-Aparicio R, Bermudez-Silva FJ, Maldonado R, Robledo P, et al. Oleylethanolamide exerts partial and dose-dependent neuroprotection of substantia nigra dopamine neurons. *Neuropharmacology*. 2009 Mar;56(3):653-64.
- Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzman M. Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr Pharm Des*. 2008;14(23):2279-88.
- Gangloff M, Gay NJ. MD-2: the Toll 'gatekeeper' in endotoxin signalling. *Trends Biochem Sci*. 2004 Jun;29(6):294-300.
- Garate I, Garcia-Bueno B, Madrigal JL, Bravo L, Berrocoso E, Caso JR, et al. Origin and consequences of brain Toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *J Neuroinflammation*. 2011 Nov 3;8:151,2094-8-151.
- Garate I, Garcia-Bueno B, Madrigal JL, Caso JR, Alou L, Gomez-Lus ML, et al. Stress-induced neuroinflammation: role of the Toll-like receptor-4 pathway. *Biol Psychiatry*. 2013 Jan 1;73(1):32-43.
- Garcia-Bueno B, Caso JR, Leza JC. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008 Aug;32(6):1136-51.

- Garcia-Bueno B, Perez-Nievas BG, Leza JC. Is there a role for the nuclear receptor PPARgamma in neuropsychiatric diseases? *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010 Nov;13(10):1411-29.
- Garcia-Bueno B, Serrats J, Sawchenko PE. Cerebrovascular cyclooxygenase-1 expression, regulation, and role in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by inflammatory stimuli. *J Neurosci*. 2009 Oct 14;29(41):12970-81.
- Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol*. 2001 Feb;2(2):108-15.
- Gimenez MA, Sim JE, Russell JH. TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation. *J Neuroimmunol*. 2004 Jun;151(1-2):116-25.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):918-34.
- Gonzalez-Aparicio R, Blanco E, Serrano A, Pavon FJ, Parsons LH, Maldonado R, et al. The systemic administration of oleoylethanolamide exerts neuroprotection of the nigrostriatal system in experimental Parkinsonism. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014 Mar;17(3):455-68.
- Gordon CJ. Response of the thermoregulatory system to toxic insults. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2010 Jan 1;2:293-311.
- Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry*. 2008 Jul;13(7):717-28.
- Griffin G, Tao Q, Abood ME. Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Mar;292(3):886-94.
- Gruber A, Mancek M, Wagner H, Kirschning CJ, Jerala R. Structural model of MD-2 and functional role of its basic amino acid clusters involved in cellular lipopolysaccharide recognition. *J Biol Chem*. 2004 Jul 2;279(27):28475-82.
- Guerri C, Pascual M. Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence. *Alcohol*. 2010 Feb;44(1):15-26.
- Guzman M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blazquez C, Piomelli D. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J Biol Chem*. 2004 Jul 2;279(27):27849-54.
- Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med*. 1994 Jan 1;179(1):269-77.
- Halassa MM, Haydon PG. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:335-55.
- Hannestad J, DellaGioia N, Bloch M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology*. 2011 Nov;36(12):2452-9.
- Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B, Persidsky Y. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic Biol Med*. 2008 Dec 1;45(11):1542-50.
- Hartley DE, Elsabagh S, File SE. Binge drinking and sex: effects on mood and cognitive function in healthy young volunteers. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004 Jul;78(3):611-9.
- Hatzigiakoumis DS, Martinotti G, Giannantonio MD, Janiri L. Anhedonia and substance dependence: clinical correlates and treatment options. *Front Psychiatry*. 2011 Mar 17;2:10.

- Hauer D, Schelling G, Gola H, Campolongo P, Morath J, Roozendaal B, et al. Plasma concentrations of endocannabinoids and related primary fatty acid amides in patients with post-traumatic stress disorder. *PLoS One*. 2013 May 7;8(5):e62741.
- Hayley S. Toward an anti-inflammatory strategy for depression. *Front Behav Neurosci*. 2011 Apr 13;5:19.
- He J, Crews FT. Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp Neurol*. 2008 Apr;210(2):349-58.
- Heinz A, Schmidt LG, Reischies FM. Anhedonia in schizophrenic, depressed, or alcohol-dependent patients--neurobiological correlates. *Pharmacopsychiatry*. 1994 Jul;27 Suppl 1:7-10.
- Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*. 2013 Jan 31;493(7434):674-8.
- Heneka MT, Landreth GE. PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1771(8):1031-45.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*. 2010 Jan 14;463(7278):232-6.
- Hensley K. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation. *J Alzheimers Dis*. 2010;21(1):1-14.
- Hill MN, Miller GE, Carrier EJ, Gorzalka BB, Hillard CJ. Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Sep;34(8):1257-62.
- Hill MN, Patel S, Campolongo P, Tasker JG, Wotjak CT, Bains JS. Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. *J Neurosci*. 2010 Nov 10;30(45):14980-6.
- Hingson RW, Heeren T, Winter MR. Age at drinking onset and alcohol dependence: age at onset, duration, and severity. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2006 Jul;160(7):739-46.
- Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012 Jan;18 Suppl 1:S210-2.
- Ho WS, Barrett DA, Randall MD. 'Entourage' effects of N-palmitoylethanolamide and N-oleoylethanolamide on vasorelaxation to anandamide occur through TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol*. 2008 Nov;155(6):837-46.
- Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013 Aug 2;12:86,4598-12-86.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*. 1999 Apr 1;162(7):3749-52.
- Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med*. 2009 Feb;71(2):171-86.
- Hsieh HL, Yang CM. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Biomed Res Int*. 2013;2013:484613.

Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol*. 2003 May;3(5):371-82.

Inohara N, Nunez G. ML -- a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. *Trends Biochem Sci*. 2002 May;27(5):219-21.

Inoue M, Williams KL, Oliver T, Vandenabeele P, Rajan JV, Miao EA, et al. Interferon-beta therapy against EAE is effective only when development of the disease depends on the NLRP3 inflammasome. *Sci Signal*. 2012 May 22;5(225):ra38.

Janiri L, Martinotti G, Dario T, Reina D, Paparello F, Pozzi G, et al. Anhedonia and substance-related symptoms in detoxified substance-dependent subjects: a correlation study. *Neuropsychobiology*. 2005;52(1):37-44.

Jean-Gilles L, Feng S, Tench CR, Chapman V, Kendall DA, Barrett DA, et al. Plasma endocannabinoid levels in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2009 Dec 15;287(1-2):212-5.

Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, et al. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol*. 2005 Jun;6(6):565-70.

Jin P, Yu HL, Tian-Lan, Zhang F, Quan ZS. Antidepressant-like effects of oleoylethanolamide in a mouse model of chronic unpredictable mild stress. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015 Jun;133:146-54.

Jin XH, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Discovery and characterization of a Ca<sup>2+</sup>-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferase generating the anandamide precursor and its congeners. *J Biol Chem*. 2007 Feb 9;282(6):3614-23.

Jones BA, Beamer M, Ahmed S. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv*. 2010 Oct;10(5):263-70.

Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 2005 Sep 15;175(6):3463-8.

Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Tiger G, Fowler CJ. Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *Br J Pharmacol*. 2001 Aug;133(8):1263-75.

Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 19;93(6):2317-21.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010 May;11(5):373-84.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):816-25.

Kenny PJ. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Oct 20;12(11):638-51.

Keshavarzian A, Farhadi A, Forsyth CB, Rangan J, Jakate S, Shaikh M, et al. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J Hepatol*. 2009 Mar;50(3):538-47.

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011 Apr;91(2):461-553.

- Kielian T. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res.* 2006 Apr;83(5):711-30.
- Koch M, Kreutz S, Bottger C, Benz A, Maronde E, Ghadban C, et al. Palmitoylethanolamide protects dentate gyrus granule cells via peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *Neurotox Res.* 2011 Feb;19(2):330-40.
- Koo JW, Duman RS. IL-1 $\beta$  is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jan 15;105(2):751-6.
- Korbo L. Glial cell loss in the hippocampus of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999 Jan;23(1):164-8.
- Kovacic P, Somanathan R. Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive oxygen species. *Curr Neuroparmacol.* 2012 Dec;10(4):289-302.
- Kril JJ, Halliday GM. Brain shrinkage in alcoholics: a decade on and what have we learned? *Prog Neurobiol.* 1999 Jul;58(4):381-7.
- Kubera M, Curzytek K, Duda W, Leskiewicz M, Basta-Kaim A, Budziszewska B, et al. A new animal model of (chronic) depression induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration for 4 months. *Brain Behav Immun.* 2013 Jul;31:96-104.
- Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec;1(6):a001651.
- Le Foll B, Di Ciano P, Panlilio LV, Goldberg SR, Ciccocioppo R. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists as promising new medications for drug addiction: preclinical evidence. *Curr Drug Targets.* 2013 Jun;14(7):768-76.
- Leclercq S, Cani PD, Neyrinck AM, Starkel P, Jamar F, Mikolajczak M, et al. Role of intestinal permeability and inflammation in the biological and behavioral control of alcohol-dependent subjects. *Brain Behav Immun.* 2012 Aug;26(6):911-8.
- Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, Neyrinck AM, Jamar F, Starkel P, et al. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Oct 21;111(42):E4485-93.
- Leon LR. Hypothermia in systemic inflammation: role of cytokines. *Front Biosci.* 2004 May 1;9:1877-88.
- Li S, Ballou LR, Morham SG, Blatteis CM. Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin-1 $\beta$ . *Brain Res.* 2001 Aug 10;910(1-2):163-73.
- Lima IV, Bastos LF, Limborco-Filho M, Fiebich BL, de Oliveira AC. Role of prostaglandins in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:946813.
- Lin HW, Basu A, Druckman C, Cicchese M, Krady JK, Levison SW. Astroglialosis is delayed in type 1 interleukin-1 receptor-null mice following a penetrating brain injury. *J Neuroinflammation.* 2006 Jun 30;3:15.
- Lindtner C, Scherer T, Zielinski E, Filatova N, Fasshauer M, Tonks NK, et al. Binge drinking induces whole-body insulin resistance by impairing hypothalamic insulin action. *Sci Transl Med.* 2013 Jan 30;5(170):170ra14.
- Liu D, Wu L, Breyer R, Mattson MP, Andreasson K. Neuroprotection by the PGE<sub>2</sub> EP<sub>2</sub> receptor in permanent focal cerebral ischemia. *Ann Neurol.* 2005 May;57(5):758-61.

- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, et al. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 5;103(36):13345-50.
- Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, et al. 4-Hydroxynonenal Induces a Cellular Redox Status-Related Activation of the Caspase Cascade for Apoptotic Cell Death. *J Cell Sci*. 2000 Feb;113 ( Pt 4)(Pt 4):635-41.
- Liu Y, Ho RC, Mak A. Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression. *J Affect Disord*. 2012 Aug;139(3):230-9.
- Liu ZW, Zhu HT, Chen KL, Qiu C, Tang KF, Niu XL. Selenium attenuates high glucose-induced ROS/TLR-4 involved apoptosis of rat cardiomyocyte. *Biol Trace Elem Res*. 2013 Dec;156(1-3):262-70.
- Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, et al. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol*. 2005 Jan;67(1):15-9.
- Long DA, Martin AJ. Factor in arachis oil depressing sensitivity to tuberculin in B.C.G.-infected guineapigs. *Lancet*. 1956 Apr 21;270(6921):464-6.
- Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005 Apr;5(4):331-42.
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol*. 2006 Jan;147 Suppl 1:S232-40.
- MacDowell KS, Caso JR, Martin-Hernandez D, Madrigal JI, Leza JC, Garcia-Bueno B. Paliperidone prevents brain toll-like receptor 4 pathway activation and neuroinflammation in rat models of acute and chronic restraint stress. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014 Oct 31;18(3):10.1093/ijnp/pyu070.
- MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal*. 2002 Jun;14(6):477-92.
- Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Bosca L, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. *J Neurochem*. 2001 Jan;76(2):532-8.
- Maes M. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1995 Jan;19(1):11-38.
- Maes M, Bosmans E, De Jongh R, Kenis G, Vandoolaeghe E, Neels H. Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. *Cytokine*. 1997 Nov;9(11):853-8.
- Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011 Apr 29;35(3):676-92.
- Maes M, Kubera M, Leunis JC, Berk M. Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut. *J Affect Disord*. 2012 Dec 1;141(1):55-62.
- Maes M, Yirmiya R, Norberg J, Brene S, Hibbeln J, Perini G, et al. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis*. 2009 Mar;24(1):27-53.



- Majchrowicz E. Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. *Psychopharmacologia*. 1975 Sep 17;43(3):245-54.
- Maldonado-Devincci AM, Badanich KA, Kirstein CL. Alcohol during adolescence selectively alters immediate and long-term behavior and neurochemistry. *Alcohol*. 2010 Feb;44(1):57-66.
- Mandrekar-Colucci S, Sauerbeck A, Popovich PG, McTigue DM. PPAR agonists as therapeutics for CNS trauma and neurological diseases. *ASN Neuro*. 2013 Dec 18;5(5):e00129.
- Marchetti L, Klein M, Schlett K, Pfizenmaier K, Eisel UL. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway. *J Biol Chem*. 2004 Jul 30;279(31):32869-81.
- Martinez JM, Garakani A, Yehuda R, Gorman JM. Proinflammatory and "resiliency" proteins in the CSF of patients with major depression. *Depress Anxiety*. 2012 Jan;29(1):32-8.
- Mascia P, Pistis M, Justinova Z, Panlilio LV, Luchicchi A, Lecca S, et al. Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of alpha-type peroxisome proliferator-activated receptors. *Biol Psychiatry*. 2011 Apr 1;69(7):633-41.
- Matias I, Gonthier MP, Petrosino S, Docimo L, Capasso R, Hoareau L, et al. Role and regulation of acylethanolamides in energy balance: focus on adipocytes and beta-cells. *Br J Pharmacol*. 2007 Nov;152(5):676-90.
- Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):852-60.
- Mayfield J, Ferguson L, Harris RA. Neuroimmune signaling: a key component of alcohol abuse. *Curr Opin Neurobiol*. 2013 Aug;23(4):513-20.
- McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*. 1999;19(2):205-19.
- McCullough L, Wu L, Haughey N, Liang X, Hand T, Wang Q, et al. Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2004 Jan 7;24(1):257-68.
- Medina KL, McQueeney T, Nagel BJ, Hanson KL, Schweinsburg AD, Tapert SF. Prefrontal cortex volumes in adolescents with alcohol use disorders: unique gender effects. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008 Mar;32(3):386-94.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):428-35.
- Meffert MK, Baltimore D. Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci*. 2005 Jan;28(1):37-43.
- Melis M, Pillolla G, Luchicchi A, Muntoni AL, Yasar S, Goldberg SR, et al. Endogenous fatty acid ethanolamides suppress nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptors. *J Neurosci*. 2008 Dec 17;28(51):13985-94.
- Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Andrew M, Overholser JC, Jurjus G, Stockmeier CA, et al. Glia pathology in the prefrontal cortex in alcohol dependence with and without depressive symptoms. *Biol Psychiatry*. 2002 Dec 15;52(12):1121-33.
- Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Jan;3(1):36-46.

- Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004 Sep;63(9):901-10.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1760-5.
- Monji A, Kato TA, Mizoguchi Y, Horikawa H, Seki Y, Kasai M, et al. Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013 Apr 5;42:115-21.
- Montgomery SL, Bowers WJ. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012 Mar;7(1):42-59.
- Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Ceru MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*. 2004;123(1):131-45.
- Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res*. 2011 Jan;21(1):103-15.
- Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res*. 1996 Nov;26(3):235-69.
- Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem*. 1998 Jul 3;273(27):16710-4.
- Mrak RE, Griffin WS. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging*. 2005 Mar;26(3):349-54.
- Munhoz CD, Garcia-Bueno B, Madrigal JL, Lepsch LB, Scavone C, Leza JC. Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets. *Braz J Med Biol Res*. 2008 Dec;41(12):1037-46.
- Nakamura Y, Si QS, Kataoka K. Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res*. 1999 Nov;35(2):95-100.
- Nelson TF, Xuan Z, Lee H, Weitzman ER, Wechsler H. Persistence of heavy drinking and ensuing consequences at heavy drinking colleges. *J Stud Alcohol Drugs*. 2009 Sep;70(5):726-34.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005 May 27;308(5726):1314-8.
- Nishi T, Shimizu N, Hiramoto M, Sato I, Yamaguchi Y, Hasegawa M, et al. Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF-kappa B in vivo. *J Biol Chem*. 2002 Nov 15;277(46):44548-56.
- Obernier JA, Bouldin TW, Crews FT. Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002a Apr;26(4):547-57.
- Obernier JA, White AM, Swartzwelder HS, Crews FT. Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002b Jun;72(3):521-32.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*. 2004 Feb 13;279(7):5298-305.

Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD, Tang SC, Mattson MP, Arumugam TV. Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res Rev.* 2009 Mar;59(2):278-92.

Okvist A, Johansson S, Kuzmin A, Bazov I, Merino-Martinez R, Ponomarev I, et al. Neuroadaptations in human chronic alcoholics: dysregulation of the NF-kappaB system. *PLoS One.* 2007 Sep 26;2(9):e930.

Oliere S, Joliette-Riopel A, Potvin S, Jutras-Aswad D. Modulation of the endocannabinoid system: vulnerability factor and new treatment target for stimulant addiction. *Front Psychiatry.* 2013 Sep 23;4:109.

Olney JW, Tenkova T, Dikranian K, Muglia LJ, Jermakowicz WJ, D'Sa C, et al. Ethanol-induced caspase-3 activation in the in vivo developing mouse brain. *Neurobiol Dis.* 2002 Mar;9(2):205-19.

O'Neill L. The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem Soc Trans.* 2000 Oct;28(5):557-63.

Organización Mundial de la Salud. "Global status report on alcohol and health". 2014.

Orio L, Edwards S, George O, Parsons LH, Koob GF. A role for the endocannabinoid system in the increased motivation for cocaine in extended-access conditions. *J Neurosci.* 2009 Apr 15;29(15):4846-57.

Orio L, O'Shea E, Sanchez V, Pradillo JM, Escobedo I, Camarero J, et al. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine increases interleukin-1beta levels and activates microglia in rat brain: studies on the relationship with acute hyperthermia and 5-HT depletion. *J Neurochem.* 2004 Jun;89(6):1445-53.

Orio L, Pavon FJ, Blanco E, Serrano A, Araos P, Pedraz M, et al. Lipid transmitter signaling as a new target for treatment of cocaine addiction: new roles for acylethanolamides and lysophosphatidic acid. *Curr Pharm Des.* 2013;19(40):7036-49.

Ortega-Gutierrez S, Molina-Holgado E, Guaza C. Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia.* 2005 Nov 1;52(2):163-8.

Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, et al. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab.* 2006 Mar;3(3):167-75.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):315-424.

Paljarvi T, Koskenvuo M, Poikolainen K, Kauhanen J, Sillanmaki L, Makela P. Binge drinking and depressive symptoms: a 5-year population-based cohort study. *Addiction.* 2009 Jul;104(7):1168-78.

Pandey GN, Rizavi HS, Ren X, Bhaumik R, Dwivedi Y. Toll-like receptors in the depressed and suicide brain. *J Psychiatr Res.* 2014 Jun;53:62-8.

Pandey S, Agrawal DK. Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. *Immunol Cell Biol.* 2006 Aug;84(4):333-41.

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science.* 2011 Sep 9;333(6048):1456-8.

Pascual M, Blanco AM, Cauli O, Minarro J, Guerri C. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur J Neurosci.* 2007 Jan;25(2):541-50.

Pascual-Lucas M, Fernandez-Lizarbe S, Montesinos J, Guerri C. LPS or ethanol triggers clathrin- and rafts/caveolae-dependent endocytosis of TLR4 in cortical astrocytes. *J Neurochem*. 2014 May;129(3):448-62.

Patrick ME, Schulenberg JE. Prevalence and predictors of adolescent alcohol use and binge drinking in the United States. *Alcohol Res*. 2013;35(2):193-200.

Pavon FJ, Araos P, Pastor A, Calado M, Pedraz M, Campos-Cloute R, et al. Evaluation of plasma-free endocannabinoids and their congeners in abstinent cocaine addicts seeking outpatient treatment: impact of psychiatric co-morbidity. *Addict Biol*. 2013 Nov;18(6):955-69.

Perez-Nievas BG, Madrigal JL, Garcia-Bueno B, Zoppi S, Leza JC. Corticosterone basal levels and vulnerability to LPS-induced neuroinflammation in the rat brain. *Brain Res*. 2010 Feb 22;1315:159-68.

Pertwee RG. Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012 Dec 5;367(1607):3353-63.

Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev*. 2006 Sep;52(2):201-43.

Plant MA, Plant ML, Miller P, Gmel G, Kuntsche S. The social consequences of binge drinking: a comparison of young adults in six European countries. *J Addict Dis*. 2009 Oct;28(4):294-308.

Plaza-Zabala A, Berrendero F, Suarez J, Bermudez-Silva FJ, Fernandez-Espejo E, Serrano A, et al. Effects of the endogenous PPAR-alpha agonist, oleoylethanolamide on MDMA-induced cognitive deficits in mice. *Synapse*. 2010 May;64(5):379-89.

Ponferrada A, Caso JR, Alou L, Colon A, Sevillano D, Moro MA, et al. The role of PPARgamma on restoration of colonic homeostasis after experimental stress-induced inflammation and dysfunction. *Gastroenterology*. 2007 May;132(5):1791-803.

Qin L, Crews FT. Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation*. 2012 Jun 18;9:130,2094-9-130.

Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation*. 2008 Mar 18;5:10,2094-5-10.

Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007 Apr 1;55(5):453-62.

Quan N, Whiteside M, Herkenham M. Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience*. 1998 Mar;83(1):281-93.

Raetz CR. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 1990;59:129-70.

Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity*. 2009 Nov 20;31(5):711-21.

Ransohoff RM, Liu L, Cardona AE. Chemokines and chemokine receptors: multipurpose players in neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol*. 2007;82:187-204.

Rehm J, Room R, Graham K, Monteiro M, Gmel G, Sempos CT. The relationship of average volume of alcohol consumption and patterns of drinking to burden of disease: an overview. *Addiction*. 2003 Sep;98(9):1209-28.

- Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, Kraus T, Haack M, Morag A, et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry*. 2001 May;58(5):445-52.
- Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol*. 2009 Jun;9(6):429-39.
- Rivest S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*. 2001 Nov;26(8):761-88.
- Rivier C. Alcohol stimulates ACTH secretion in the rat: mechanisms of action and interactions with other stimuli. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996 Apr;20(2):240-54.
- Roche M, Kelly JP, O'Driscoll M, Finn DP. Augmentation of endogenous cannabinoid tone modulates lipopolysaccharide-induced alterations in circulating cytokine levels in rats. *Immunology*. 2008 Oct;125(2):263-71.
- Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, et al. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*. 2001 Nov 8;414(6860):209-12.
- Roques BP, Fournie-Zaluski MC, Wurm M. Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Apr;11(4):292-310.
- Rosenblat JD, Cha DS, Mansur RB, McIntyre RS. Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014 Aug 4;53:23-34.
- Ross RA, Brockie HC, Pertwee RG. Inhibition of nitric oxide production in RAW264.7 macrophages by cannabinoids and palmitoylethanolamide. *Eur J Pharmacol*. 2000 Aug 4;401(2):121-30.
- Rothwell NJ, Luheshi GN. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*. 2000 Dec;23(12):618-25.
- Rouzer CA, Marnett LJ. Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways. *Chem Rev*. 2011 Oct 12;111(10):5899-921.
- Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 2007 Dec;152(7):1092-101.
- Saha RN, Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2006 May-Jun;8(5-6):929-47.
- Salaga M, Sobczak M, Fichna J. Inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) as a novel therapeutic strategy in the treatment of pain and inflammatory diseases in the gastrointestinal tract. *Eur J Pharm Sci*. 2014 Feb 14;52:173-9.
- Sapolsky RM. Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression? *Biol Psychiatry*. 2004 Aug 1;56(3):137-9.
- Sarandol A, Sarandol E, Eker SS, Erdinc S, Vatansever E, Kirli S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. *Hum Psychopharmacol*. 2007 Mar;22(2):67-73.
- Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005 Feb;29(2):201-17.
- Schmidt HD, Duman RS. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav Pharmacol*. 2007 Sep;18(5-6):391-418.

Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. 1990 Sep 21;249(4975):1429-31.

Seibert K, Masferrer J, Zhang Y, Gregory S, Olson G, Hauser S, et al. Mediation of inflammation by cyclooxygenase-2. *Agents Actions Suppl*. 1995;46:41-50.

Semple BD, Frugier T, Morganti-Kossmann MC. CCL2 modulates cytokine production in cultured mouse astrocytes. *J Neuroinflammation*. 2010a Oct 14;7:67,2094-7-67.

Semple BD, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010b Mar;30(3):459-73.

Serrano A, Parsons LH. Endocannabinoid influence in drug reinforcement, dependence and addiction-related behaviors. *Pharmacol Ther*. 2011 Dec;132(3):215-41.

Sharir H, Console-Bram L, Mundy C, Popoff SN, Kapur A, Abood ME. The endocannabinoids anandamide and virodhamine modulate the activity of the candidate cannabinoid receptor GPR55. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012 Dec;7(4):856-65.

Shastri A, Bonifati DM, Kishore U. Innate immunity and neuroinflammation. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:342931.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 1999 Jun 7;189(11):1777-82.

Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1999 Jun;10(2):119-30.

Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*. 2010 Oct 8;7(4):483-95.

Simon GM, Cravatt BF. Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J Biol Chem*. 2008 Apr 4;283(14):9341-9.

Simon GM, Cravatt BF. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem*. 2006 Sep 8;281(36):26465-72.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010 Jan;119(1):7-35.

Song C, Halbreich U, Han C, Leonard BE, Luo H. Imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, and between Th1 and Th2 cytokines in depressed patients: the effect of electroacupuncture or fluoxetine treatment. *Pharmacopsychiatry*. 2009 Sep;42(5):182-8.

Song C, Wang H. Cytokines mediated inflammation and decreased neurogenesis in animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011 Apr 29;35(3):760-8.

Sorrells SF, Sapolsky RM. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun*. 2007 Mar;21(3):259-72.

Spooren A, Kolmus K, Laureys G, Clinckers R, De Keyser J, Haegeman G, et al. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res Rev*. 2011 Jun 24;67(1-2):157-83.

- Stephens MA, Wand G. Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol Res.* 2012;34(4):468-83.
- Stopponi S, de Guglielmo G, Somaini L, Cippitelli A, Cannella N, Kallupi M, et al. Activation of PPARgamma by pioglitazone potentiates the effects of naltrexone on alcohol drinking and relapse in mSP rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2013 Aug;37(8):1351-60.
- Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia.* 2002 Nov;40(2):133-9.
- Suardiaz M, Estivill-Torrus G, Goicoechea C, Bilbao A, Rodriguez de Fonseca F. Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain.* 2007 Dec 15;133(1-3):99-110.
- Sun Y, Alexander SP, Garle MJ, Gibson CL, Hewitt K, Murphy SP, et al. Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol.* 2007 Nov;152(5):734-43.
- Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, et al. Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J.* 2004 Jun 15;380(Pt 3):749-56.
- Sundell L, Salomaa V, Vartiainen E, Poikolainen K, Laatikainen T. Increased stroke risk is related to a binge-drinking habit. *Stroke.* 2008 Dec;39(12):3179-84.
- Tajuddin N, Moon KH, Marshall SA, Nixon K, Neafsey EJ, Kim HY, et al. Neuroinflammation and neurodegeneration in adult rat brain from binge ethanol exposure: abrogation by docosahexaenoic acid. *PLoS One.* 2014 Jul 16;9(7):e101223.
- Takadera T, Yumoto H, Tozuka Y, Ohyashiki T. Prostaglandin E(2) induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells. *Neurosci Lett.* 2002 Jan 11;317(2):61-4.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):805-20.
- Tapert SF, Schweinsburg AD, Barlett VC, Brown SA, Frank LR, Brown GG, et al. Blood oxygen level dependent response and spatial working memory in adolescents with alcohol use disorders. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004 Oct;28(10):1577-86.
- Tellez LA, Medina S, Han W, Ferreira JG, Licon-Limon P, Ren X, et al. A gut lipid messenger links excess dietary fat to dopamine deficiency. *Science.* 2013 Aug 16;341(6147):800-2.
- Tham CS, Whitaker J, Luo L, Webb M. Inhibition of microglial fatty acid amide hydrolase modulates LPS stimulated release of inflammatory mediators. *FEBS Lett.* 2007 Jun 26;581(16):2899-904.
- Thompson WL, Van Eldik LJ. Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes [corrected. *Brain Res.* 2009 Sep 1;1287:47-57.
- Thundiyil J, Lim KL. DAMPs and Neurodegeneration. *Ageing Res Rev.* 2014 Nov 24.
- Tian L, Ma L, Kaarela T, Li Z. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. *J Neuroinflammation.* 2012 Jul 2;9:155,2094-9-155.
- Tiwari V, Chopra K. Resveratrol prevents alcohol-induced cognitive deficits and brain damage by blocking inflammatory signaling and cell death cascade in neonatal rat brain. *J Neurochem.* 2011 May;117(4):678-90.
- Townshend JM, Duka T. Binge drinking, cognitive performance and mood in a population of young social drinkers. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005 Mar;29(3):317-25.

Tsuboi K, Sun YX, Okamoto Y, Araki N, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the choloylglycine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *J Biol Chem*. 2005 Mar 25;280(12):11082-92.

Ueda N. Endocannabinoid hydrolases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002 Aug;68-69:521-34.

Ueda N, Yamanaka K, Yamamoto S. Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *J Biol Chem*. 2001 Sep 21;276(38):35552-7.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.

Valles SL, Blanco AM, Pascual M, Guerri C. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol*. 2004 Oct;14(4):365-71.

Vallieres L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci*. 2002 Jan 15;22(2):486-92.

Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol*. 2008 May;154(2):299-315.

Vetreno RP, Crews FT. Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and Toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2012 Dec 13;226:475-88.

Vetreno RP, Qin L, Crews FT. Increased receptor for advanced glycation end product expression in the human alcoholic prefrontal cortex is linked to adolescent drinking. *Neurobiol Dis*. 2013 Nov;59:52-62.

Viceconte N, Burguillos MA, Herrera AJ, De Pablos RM, Joseph B, Venero JL. Neuromelanin activates proinflammatory microglia through a caspase-8-dependent mechanism. *J Neuroinflammation*. 2015 Jan 14;12:5,014-0228-x.

Villarroya F, Iglesias R, Giral M. PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *PPAR Res*. 2007;2007:74364.

Vyas S, Maatouk L. Contribution of glucocorticoids and glucocorticoid receptors to the regulation of neurodegenerative processes. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013 Dec;12(8):1175-93.

Wang G, Namura S. Effects of chronic systemic treatment with peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators on neuroinflammation induced by intracerebral injection of lipopolysaccharide in adult mice. *Neurosci Res*. 2011 Jun;70(2):230-7.

Wang HJ, Zakhari S, Jung MK. Alcohol, inflammation, and gut-liver-brain interactions in tissue damage and disease development. *World J Gastroenterol*. 2010 Mar 21;16(11):1304-13.

Wang X, Miyares RL, Ahern GP. Oleoylethanolamide excites vagal sensory neurones, induces visceral pain and reduces short-term food intake in mice via capsaicin receptor TRPV1. *J Physiol*. 2005 Apr 15;564(Pt 2):541-7.

Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res*. 2010 Apr;49(2):97-107.

Ward RJ, Lallemand F, de Witte P. Biochemical and neurotransmitter changes implicated in alcohol-induced brain damage in chronic or 'binge drinking' alcohol abuse. *Alcohol Alcohol*. 2009 Mar-Apr;44(2):128-35.



Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:125-63.

Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J Biol Chem*. 2006 Dec 1;281(48):36569-78.

Weissenborn R, Duka T. Acute alcohol effects on cognitive function in social drinkers: their relationship to drinking habits. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003 Jan;165(3):306-12.

Whitman BA, Knapp DJ, Werner DF, Crews FT, Breese GR. The cytokine mRNA increase induced by withdrawal from chronic ethanol in the sterile environment of brain is mediated by CRF and HMGB1 release. *Alcohol Clin Exp Res*. 2013 Dec;37(12):2086-97.

Wozniak DF, Hartman RE, Boyle MP, Vogt SK, Brooks AR, Tenkova T, et al. Apoptotic neurodegeneration induced by ethanol in neonatal mice is associated with profound learning/memory deficits in juveniles followed by progressive functional recovery in adults. *Neurobiol Dis*. 2004 Dec;17(3):403-14.

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990 Sep 21;249(4975):1431-3.

Wu Y, Lousberg EL, Moldenhauer LM, Hayball JD, Collier JK, Rice KC, et al. Inhibiting the TLR4-MyD88 signalling cascade by genetic or pharmacological strategies reduces acute alcohol-induced sedation and motor impairment in mice. *Br J Pharmacol*. 2012 Mar;165(5):1319-29.

Wu Y, Lousberg EL, Moldenhauer LM, Hayball JD, Robertson SA, Collier JK, et al. Attenuation of microglial and IL-1 signaling protects mice from acute alcohol-induced sedation and/or motor impairment. *Brain Behav Immun*. 2011 Jun;25 Suppl 1:S155-64.

Xu J, Chavis JA, Racke MK, Drew PD. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and retinoid X receptor agonists inhibit inflammatory responses of astrocytes. *J Neuroimmunol*. 2006 Jul;176(1-2):95-105.

Xu J, Storer PD, Chavis JA, Racke MK, Drew PD. Agonists for the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and the retinoid X receptor inhibit inflammatory responses of microglia. *J Neurosci Res*. 2005 Aug 1;81(3):403-11.

Xu Y, Wang C, Klabnik JJ, O'Donnell JM. Novel therapeutic targets in depression and anxiety: antioxidants as a candidate treatment. *Curr Neuropharmacol*. 2014 Mar;12(2):108-19.

Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*. 1993 Aug;11(2):371-86.

Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain Res*. 1999 Jun 5;830(2):226-36.

Yirmiya R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Res*. 1996 Mar 4;711(1-2):163-74.

Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun*. 2011 Feb;25(2):181-213.

Yoshimura R, Hori H, Ikenouchi-Sugita A, Umene-Nakano W, Ueda N, Nakamura J. Higher plasma interleukin-6 (IL-6) level is associated with SSRI- or SNRI-refractory depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Jun 15;33(4):722-6.

- Zahr NM, Alt C, Mayer D, Rohlfing T, Manning-Bog A, Luong R, et al. Associations between in vivo neuroimaging and postmortem brain cytokine markers in a rodent model of Wernicke's encephalopathy. *Exp Neurol*. 2014 Nov;261:109-19.
- Zahr NM, Sullivan EV. Translational studies of alcoholism: bridging the gap. *Alcohol Res Health*. 2008;31(3):215-30.
- Zeigler DW, Wang CC, Yoast RA, Dickinson BD, McCaffree MA, Robinowitz CB, et al. The neurocognitive effects of alcohol on adolescents and college students. *Prev Med*. 2005 Jan;40(1):23-32.
- Zhang Y, Liu L, Peng YL, Liu YZ, Wu TY, Shen XL, et al. Involvement of inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced mice depressive-like behaviors. *CNS Neurosci Ther*. 2014 Feb;20(2):119-24.
- Zhou H, Andonegui G, Wong CH, Kubes P. Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation. *J Immunol*. 2009 Oct 15;183(8):5244-50.
- Zhou Y, Yang L, Ma A, Zhang X, Li W, Yang W, et al. Orally administered oleoylethanolamide protects mice from focal cerebral ischemic injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Neuropharmacology*. 2012 Aug;63(2):242-9.
- Zogopoulos P, Vasileiou I, Patsouris E, Theocharis S. The neuroprotective role of endocannabinoids against chemical-induced injury and other adverse effects. *J Appl Toxicol*. 2013 Apr;33(4):246-64.
- Zolese G, Bacchetti T, Masciangelo S, Ragni L, Ambrosi S, Ambrosini A, et al. Effect of acylethanolamides on lipid peroxidation and paraoxonase activity. *Biofactors*. 2008;33(3):201-9.
- Zou J, Crews F. CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. *Cell Mol Neurobiol*. 2006 Jul-Aug;26(4-6):385-405.
- Zou JY, Crews FT. Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling. *PLoS One*. 2014 Feb 14;9(2):e87915.
- Zou JY, Martinez DB, Neafsey EJ, Collins MA. Binge ethanol-induced brain damage in rats: effect of inhibitors of nitric oxide synthase. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996 Nov;20(8):1406-11.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 1999 Jul 29;400(6743):452-7.